

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Étude de l'effet du stress oxydatif sur le cycle cellulaire et infectieux de *Brucella abortus*

Zeippen, Nicolas

Award date:
2016

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**UNIVERSITÉ
DE NAMUR**

UNIVERSITE DE NAMUR

Faculté des Sciences

**ETUDE DE L'EFFET DU STRESS OXYDATIF SUR L'INFECTION ET LE CYCLE
CELLULAIRE DE *BRUCELLA ABORTUS***

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Nicolas Zeippen

Janvier 2016

Université de Namur
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@unamur.be - <http://www.unamur.be>

Etude de l'effet du stress oxydatif sur le cycle cellulaire et infectieux de *Brucella abortus*

ZEIPPEN Nicolas

Résumé

Brucella abortus est une bactérie Gram négatif, faisant partie de la famille des α -protéobactéries. C'est un pathogène intracellulaire responsable d'une zoonose mondialement répandue nommée brucellose. Elle infecte le bétail, causant avortements chez les femelles et stérilité chez les mâles. La maladie peut aussi être transmise à l'homme, bien que l'infection soit alors considérée comme accidentelle : la bactérie ne peut plus se transmettre à un autre hôte par après. Des études ont précédemment montré que les *Brucella* en G1 (qui n'ont pas encore initié la réplication de leur ADN) infectent plus efficacement les cellules HeLa et les macrophages RAW 264.7, et voient leur cycle cellulaire bloqué durant les premières heures suivant l'internalisation (Deghelt et al. 2014). Ici, nous tentons de mettre en évidence la nature de l'avantage sélectif du stade G1 par rapport aux autres stades dans les compartiments dérivés des endosomes. Nous avons avancé l'hypothèse que les bactéries en G1 ont été sélectionnées pour faire face à différents stress qui pourraient éventuellement endommager leur ADN durant cette étape. Cette hypothèse est supportée par les données apportées par le travail de Katy Poncin. En effet, une accumulation en G1 est observable dans une population stressée par un agent alkylant, indiquant un possible avantage sélectif pour ce stade dans ces conditions. Ici, nous avons testé un autre stress pour voir si ces résultats pouvaient aussi être applicables à d'autres agents endommageant l'ADN : le stress oxydatif. Les dommages à l'ADN tenant un rôle central dans notre hypothèse, nous avons également décidé de caractériser des souches mutantes pour un système de réparation des lésions occasionnées par l'oxydation des acides nucléiques. Les résultats obtenus n'ont montré aucune accumulation en G1 suivant le stress oxydatif et aucune différence significative de sensibilité au stress oxydatif ou en infection entre les différentes souches. Ces résultats nous ont poussé à nous poser des questions quant à la capacité de *Brucella* de résister au stress oxydatif. Cependant, la comparaison de la sensibilité à l' H_2O_2 entre *B. abortus* et *Escherichia coli* n'a pas montré de différence significative entre les deux bactéries. Dès lors, si *Brucella* ne montre pas de capacité particulière pour résister au stress oxydatif, il est donc possible qu'elle évite ce stress durant la première phase d'infection cellulaire plutôt que de le combattre. Nous testons actuellement cette hypothèse et tentons de mettre au point un outil permettant de voir si oui ou non *B. abortus* ressent un stress oxydatif en infection: le marquage à l'OxyBURST®. C'est une sonde qui devient fluorescente lorsqu'elle est oxydée par du peroxyde d'hydrogène.

Remerciements

Cet ouvrage représente l'accomplissement d'un travail qui aura duré dix mois. Celui-ci n'aurait pas été possible sans la précieuse aide et le soutien de toute une série de personnes.

Je tiens donc à débiter cet écrit par le remerciement du Professeur Xavier De Bolle, mon promoteur pour m'avoir accueilli au sein de son équipe, et pour ses précieux conseils qui m'ont guidé tout au long de ce mémoire. Je voudrais aussi souligner sa grande disponibilité, sa sympathie, son enthousiasme et sa grande humilité.

Je remercie également ma tutrice, Katy Poncin, pour le temps qu'elle m'a accordé, pour sa patience, ses précieux conseils et pour tout ce qu'elle m'a appris, aussi bien en termes de manipulation au labo qu'en rigueur scientifique. Je la remercie aussi pour m'avoir remis sur les rails à chaque fois où cela a été nécessaire. Je te souhaite bonne continuation, et que l'alkylation soit avec toi (enfin, ne fais pas de cancer pour autant...)!

Je tiens aussi à remercier tous les autres membres de la « Xa team » : Nayla, Phuong, Vicky, J-F, et Mathilde pour tout ce qu'ils m'ont apporté et pour leur sympathie. Je n'oublierai pas l'écoute dont vous avez su faire preuve durant les « technical meeting », et pour les conseils et les idées qui en sont sortis. Je les remercie aussi pour les aides plus pratiques qu'ils ont pu m'apporter lors des manipulations. Un merci particulier à Mathilde non seulement pour son éternelle gentillesse et sa bonne humeur, mais aussi pour les années de bac que l'on aura passées ensemble et qui n'auraient pas été pareilles sans elle.

Merci aussi à Kevin pour tout ce qu'il fait pour le bon fonctionnement du B13, à Christian pour son aide avec le cytomètre de flux. Et bien sûr, un tout grand merci à Françoise, Mathieu, Aurélie et Dounia pour leur aide, le temps qu'ils nous consacrent pour le bon fonctionnement du laboratoire et pour nous simplifier la tâche au maximum.

Je dois aussi remercier l'entière de l'URBM pour leur accueil chaleureux et pour la bonne ambiance qui règne dans le laboratoire. Merci à Simon sans qui le travail au B13 serait beaucoup moins haut en couleur : « C'est systématiquement débile, mais c'est toujours inattendu. Et ça c'est très important pour la santé du cigare »¹. Je ne peux bien évidemment pas passer à côté d'Eme. Nos petites conversations sympathiques au coin de l'évier, ta bonne humeur légendaire, ta people attitude et tes petites piques vont me manquer. Merci aussi à Arnaud, pour avoir parasité le bureau dès qu'il le pouvait, pour les conversations toujours très sérieuses et très appropriées qu'il abordait avec nous et dont, je suis sûr, je me souviendrai longtemps. Merci pour la bonne humeur que tu as su nous insuffler. Et dans un contexte plus sérieux, merci pour les conseils et les infos que tu m'as prodiguées.

Je voudrais aussi exprimer ma gratitude envers la team mémo 2015 : Aurore, Gwen, Hélène, Manon, Rosie, vous êtes des stars (veuillez remarquer que par commodité, et pour éviter de heurter la sensibilité de certains, ces personnes ont été citées par ordre alphabétique et non par ordre d'importance relative) ! Je peux témoigner que ce bureau aura été témoin de pas mal de fous rires, de débordements d'amour, et aussi parfois de mauvaise humeur (non, je n'y suis

¹ Alexandre Astier, Kaamelott Livre II, 2005

strictement pour rien !), de courses sur chaise de bureau, de « petages de plombs », de blagounettes pas drôles et autres bizarreries en tous genres. Merci à Manon qui améliorait considérablement l'ambiance olfactive de la pièce avec ses thés. Merci à Aurore pour la profonde dépression qu'elle était capable de nous faire ressentir quand elle activait le mode machine de guerre de travail. Merci à Rosie pour avoir toujours su trouver le mot « juste et sympathique » dès que je prenais la parole. Merci à Hélène pour le souci qu'elle accordait à ma santé. Merci à Gwen pour toujours nous avoir rappelé que la beer hour approchait. Plus sérieusement, je vous remercie tous pour le soutien que vous m'avez apporté durant ces dix mois. Vous allez toutes me manquer.

Un merci particulier à ma famille, pour le soutien et l'aide qu'ils m'ont apporté non seulement pour ce mémoire, mais aussi pour l'ensemble de mes études. Je tiens aussi à remercier Samy qui a su rester calme quand moi je ne l'étais pas vraiment, pour sa patience, pour son soutien et pour son aide. Merci à toi d'avoir relu mon travail qui contient un tas de termes plus ou moins barbares et obscurs.

Merci aussi aux membres de mon jury pour l'attention qu'ils vont porter à ce travail, et qui, je l'espère, apprécieront ce mémoire. Je vous souhaite une bonne lecture.

Les remerciements principaux sont faits. Cependant, il reste beaucoup de personnes que je pourrais remercier, même si je ne les connais pas personnellement. En effet, leur travail aura indirectement contribué au maintien de mon équilibre mental, aussi précaire soit-il. Je suggère vivement au lecteur de sauter cette section, car elle risque d'être un peu obscure pour le non initié. Par où commencer ? Merci à Oli de Sat et Nicola Sirkis pour leur musique, merci à Queen, que j'écoute en ce moment même pour rédiger ces lignes, merci à Michael Jackson qui a bercé la rédaction de mon mi-mémoire, à Green Day et nightwish. Merci à Sir Peter Jackson pour son œuvre en terre du milieu, qui a et qui continue à m'émerveiller, et qui a su réveiller mon côté cinéophile, merci à John Logan, Sam Mendes, George Miller, George Lucas, Russell Mulcahy, James Cameron, Gore Verbinski, Andy Wachowski, Lana Wachowski, Luc Besson, Chuck Lorre, Bill Prady et Ryan Murphy. Merci à Guillermo de Toro pour l'ambiance si particulière qu'il arrive brillamment à retranscrire à l'écran (Pacific Rim excepté), et pour son travail sur P.T. A ce titre, je ne peux évidemment pas passer à côté de Monsieur Hideo Kojima, et tout le travail qu'il a effectué pour l'industrie du jeu vidéo, et merci de nous avoir fait rêver, l'espace de quelques mois avec Silent Hills. Je dois bien entendu aussi remercier Sony PlayStation entertainment, un merci tout particulier pour le travail effectué par Naughty Dog, qui réussit toujours à nous délivrer des jeux exceptionnels, merci à Square Enix pour la réalisation du remake d'un pilier du jeu vidéo, j'ai nommé final fantasy 7 ; merci à Tetsuya Nomura, Yoshinori Kitase, Mark Cerny, Michel Ancel, David Cage, Hidetaka Miyazaki, Will Wright, Andy Gavin, Jason Rubin, Amy Hennig, Lorne Lanning, Frank Ryan, Stewart Gilray, Casey Hudson, Drew Karpyshyn, Preston Watamaniuk et Mike Spalding.

« La théorie, c'est quand on sait tout et que rien ne fonctionne. La pratique, c'est quand tout fonctionne et que personne ne sait pourquoi. Ici, nous avons réuni théorie et pratique : Rien ne fonctionne... et personne ne sait pourquoi ! »

Albert Einstein

Table des matières

Table des matières	1
Liste d'abréviations	4
Introduction.....	6
1. La brucellose	6
1.1. Pathologie	6
1.2. Agent pathogène	6
1.2.a. Le genre <i>Brucella</i>	6
1.2.b. α -protéobactéries	8
2. Infection de l'hôte	8
2.1. Survie en milieu extérieur.....	8
2.2. Entrée dans l'hôte	9
3. Infection cellulaire et trafic	9
4. Blocage du cycle cellulaire	10
4.1. Suivi du cycle cellulaire de <i>Brucella abortus</i>	10
4.2. Enrichissement en G1 et blocage du cycle cellulaire	11
5. eBCV : une étape stressante.....	11
6. Le stress oxydatif	13
6.1. Production de dérivés réactifs de l'oxygène	13
6.2. Elimination des ROS	14
6.3. Dommages occasionnés.....	14
7. Systèmes de réparation de l'ADN.....	15
7.1. Base excision repair	15
7.2. Système MutM MutY MutT	15
Objectifs.....	18
1. Hypothèse	18
2. Méthodologie	18
2.1. Stress oxydatif et cycle cellulaire	18
2.2. Caractérisation du système MutM MutY MutT	18
Résultats.....	20
1. Proportion de <i>Brucella</i> en G1 cellulaire lors d'un stress oxydatif.....	20

1.1. Approche	20
1.2. Stress induit par le paraquat.....	21
1.3. Stress induit par le peroxyde d'hydrogène	21
2. Caractérisation des délétants pour le système MutM MutY MutT	22
2.1. <i>Disk assay</i>	22
2.2. Courbes de croissance	23
2.3. Infection cellulaire	24
3. Caractérisation de la résistance au stress oxydatif de <i>B. abortus</i>	24
4. Mises au point du marquage à l'OxyBURST®	24
Discussion et perspectives	27
1. Le stress oxydatif ne semble pas provoquer d'accumulation en G1	27
2. Le système MutM MutY MutT ne semble pas essentiel face au stress oxydatif	28
3. <i>B. abortus</i> éviterait le stress oxydatif plutôt que de le combattre	30
Conclusion	34
Matériel et méthodes	36
1. Souches et culture	36
1.1. <i>Brucella abortus</i>	36
1.2. <i>Escherichia coli</i>	36
1.3. Macrophages RAW 264.7	36
2. PCR.....	36
2.1. Q5®	36
2.2. GoTaq®	37
3. Ingénierie génétique	37
3.1. Purification d'ADN	37
3.2. Ligation.....	37
3.3. Transformation	37
3.4. Extraction de plasmides	37
3.5. Restriction.....	38
3.6. Conjugaison	38
3.7. Constructions	38
4. Microscopie.....	39
5. Proportion de G1 après stress oxydatif	39

6. Cytométrie de flux après stress oxydatif.....	40
7. Disk assay	40
8. Courbes de croissance	40
9. Infections.....	41
10. Marquage à l'oxyBURST® succinimidyl ester	41
10.1. Stock	41
10.2. Mises au point.....	41
Bibliographie	43

Liste d'abréviations

8-oxodG :	8-oxodeoxyribo-guanine
A	Adénine
ADN	Acide désoxyribonucléique
BCV	<i>Brucella</i> containing vacuole
BER	<i>Base excision repair</i>
C	Cytosine
CFU	<i>Colony forming unit</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DO	Densité optique
G	Guanine
GMP	Guanosine monophosphate
GTP	Guanosine triphosphate
LPS	Lipopolysaccharide
Mb	Mégabase
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
NAD(P)H	Nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldéhyde
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (dérivés réactifs de l'oxygène)
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SOD	Superoxyde dismutase
TRSE	Texas Red succinimidyl ester
WT	<i>Wild type</i> (souche sauvage)
YFP	<i>Yellow fluorescent protein</i>

Introduction

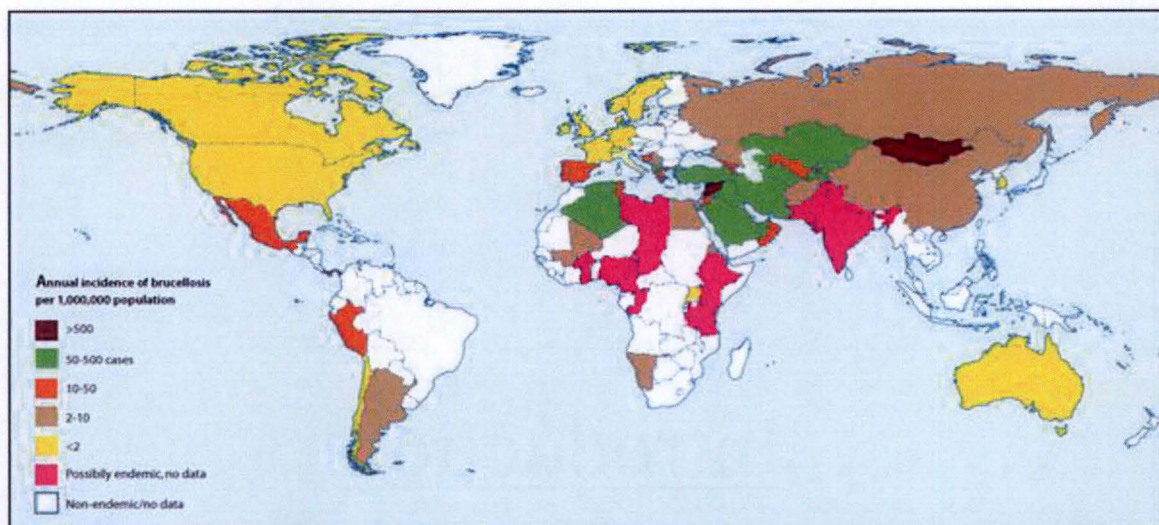


Figure 1: Incidence de la brucellose humaine dans le monde. (Ariza et al., 2007).

Introduction

1. La brucellose

1.1. Pathologie

La brucellose, aussi connue chez l'homme sous le nom de fièvre de Malte, ou encore fièvre ondulante, est une zoonose de première importance. Elle est mondialement répandue, et plus particulièrement dans les pays en voie de développement (**Figure 1**) (Carvalho Neta et al., 2010; Moreno and Moriyón, 2006). Chez l'animal, cette maladie est caractérisée par des avortements chez la femelle et des épидidymites chez le mâle pouvant mener à la stérilité (Moreno and Moriyón, 2006). Chez l'homme, la maladie peut se présenter sous des formes très différentes : il n'existe pas une liste de symptômes associés à la maladie que tous les patients vont exprimer. En effet, tous les malades ne vont pas montrer les mêmes manifestations de la maladie, parmi lesquels on peut retrouver, entre autres, des maux de tête, des douleurs articulaires et musculaires, spléno- et hépatomégalie, ou encore des vomissements. Cependant, cette pathologie est très souvent caractérisée par une fièvre ondulante, d'où elle tire son nom (Moreno and Moriyón, 2006). La brucellose est une maladie grave chez l'homme et potentiellement mortelle sur le long terme si non traitée (Galińska and Zagórski, 2013; Moreno, 2014).

La variabilité de la maladie d'un individu à l'autre ainsi que la non-spécificité des symptômes la rend plutôt difficile à diagnostiquer. En effet, les symptômes ne se déclarant pas tous chez un individu, et pouvant aussi être attribués à d'autres pathologies, le diagnostic erroné est fréquent. Il est donc important de déterminer le passé du patient afin d'évaluer s'il a pu ou non être en contact avec *Brucella*. Si la maladie est suspectée, plusieurs tests peuvent être effectués en laboratoire. Il en existe deux types. D'une part, les tests directs visent à mettre en évidence la présence de la bactérie vivante dans l'organisme, typiquement par des cultures. Cependant, ces tests manquent de sensibilité. D'autre part, les tests indirects montrent plutôt les conséquences de l'infection par *Brucella* dans l'organisme, comme par exemple la présence d'anticorps dirigés contre le pathogène. Cependant, ils manquent de spécificité et dépendent de la bonne mise en place de la réponse immunitaire (Moreno and Moriyón, 2006).

1.2. Agent pathogène

1.2.a. Le genre *Brucella*

Brucella, l'agent responsable de la brucellose, est une bactérie Gram négative pathogène intracellulaire, facultativement extracellulaire. En effet, bien que la bactérie soit parfaitement capable de pousser en dehors d'une cellule en laboratoire, il n'a jamais été montré que ce mode de multiplication soit biologiquement pertinent dans la nature. Sa niche de réplication naturelle serait le milieu intracellulaire (Celli, 2006; Moreno and Moriyón, 2006). Dans l'organisme, la bactérie est capable d'infecter aussi bien les cellules non-phagocytaires que les phagocytes, dont les macrophages (Celli, 2006).

Les différentes espèces de *Brucella* sont capables d'infecter une large gamme de mammifères, allant du bétail aux mammifères marins en passant par les porcs, les chèvres ou

encore les moutons. Dix espèces de *Brucella* ont été identifiées à ce jour. *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. neotomae*, *B. ovis*, *B. ceti*, *B. pinnipedialis*, *B. microti* et *B. inopiniata* (Galińska and Zagórski, 2013). Bien qu'elles infectent des hôtes différents, le séquençage complet des génomes de différentes espèces de *Brucella* a montré qu'elles diffèrent très peu d'un point de vue génétique (Carvalho Neta et al., 2010). Parmi ces 10 espèces, les quatre premières ont été identifiées comme étant pathogène pour l'homme, bien que l'infection soit alors considérée comme accidentelle (Moreno and Moriyón, 2006).

Il est communément admis que la brucellose humaine se transmet majoritairement par voie orale, via le tractus digestif (Moreno and Moriyón, 2006), à partir d'un animal infecté (il n'y a pas de transmission entre humains). L'agent pathogène pouvant être retrouvé dans le lait des animaux infectés, il n'est pas étonnant que l'une des voies de transmission majeure soit la consommation de lait maternel chez les animaux, et de produits laitiers non pasteurisés chez l'homme (Moreno and Moriyón, 2006). Il est donc possible de faire la corrélation entre l'occurrence de la maladie chez l'homme et la domestication d'ongulés producteurs de lait, ainsi que des habitudes alimentaires (Moreno, 2014). Chez les animaux, les fœtus avortés provenant d'une femelle contaminée sont une source importante d'infection par léchage de ces derniers. De plus, *Brucella* étant une bactérie se transmettant facilement via les aérosols, une voie alternative de contamination passe par le reniflement de ces fœtus. Dans le même ordre d'idées, les vétérinaires ou les fermiers, qui peuvent potentiellement entrer en contact avec des fœtus contaminés sont plus susceptibles de contracter la maladie. Les chercheurs et techniciens de laboratoire travaillant sur ce pathogène peuvent eux-aussi facilement s'infecter par voie aérienne (Moreno and Moriyón, 2006).

En tant que pathogène intracellulaire, *Brucella* échappe à toute une série d'antibiotiques. En effet, certaines molécules thérapeutiques sont incapables de traverser la membrane plasmique et donc de rejoindre le milieu intracellulaire. De plus, il a été montré que l'utilisation d'un composé unique ne permet pas l'élimination totale du pathogène, et la monothérapie montre donc un nombre important de rechutes (Ariza et al., 2007). Pour une guérison totale de la maladie, il est donc nécessaire d'utiliser au moins deux antibiotiques en parallèle (doxycycline et streptomycine), et ce sur des périodes prolongées, rendant le traitement coûteux (Moreno and Moriyón, 2006).

Brucella est considérée comme une arme biologique potentielle. *B. suis* a par exemple été le premier organisme pathogène utilisé par l'armée Américaine (Paulsen et al., 2002), mais pourrait aussi être utilisée à des fins terroristes. En effet, le coût de cette maladie est élevé. *Brucella* est une bactérie très infectieuse, avec une large gamme d'hôtes, dont les animaux de rente et l'homme. Pour limiter la propagation de la maladie, il est parfois nécessaire d'abattre l'ensemble d'un troupeau où un cas de brucellose a été mis en évidence, alourdissant encore le bilan économique. Le traitement est long et coûteux, et la maladie est incapacitante si non soignée. Cet aspect incapacitant au travail a non seulement un coût économique non négligeable, mais en plus demande du temps et de l'énergie à une armée pour soigner les soldats infectés. De plus, la maladie est difficilement diagnosticable. Pour toutes ces raisons, la brucellose a été rajoutée à la liste des organismes pathogènes potentiellement utilisable en tant qu'arme, ce qui augmente encore l'intérêt porté à ce genre (Celli, 2006; Moreno and Moriyón, 2006; Robinson-Dunn, 2002).

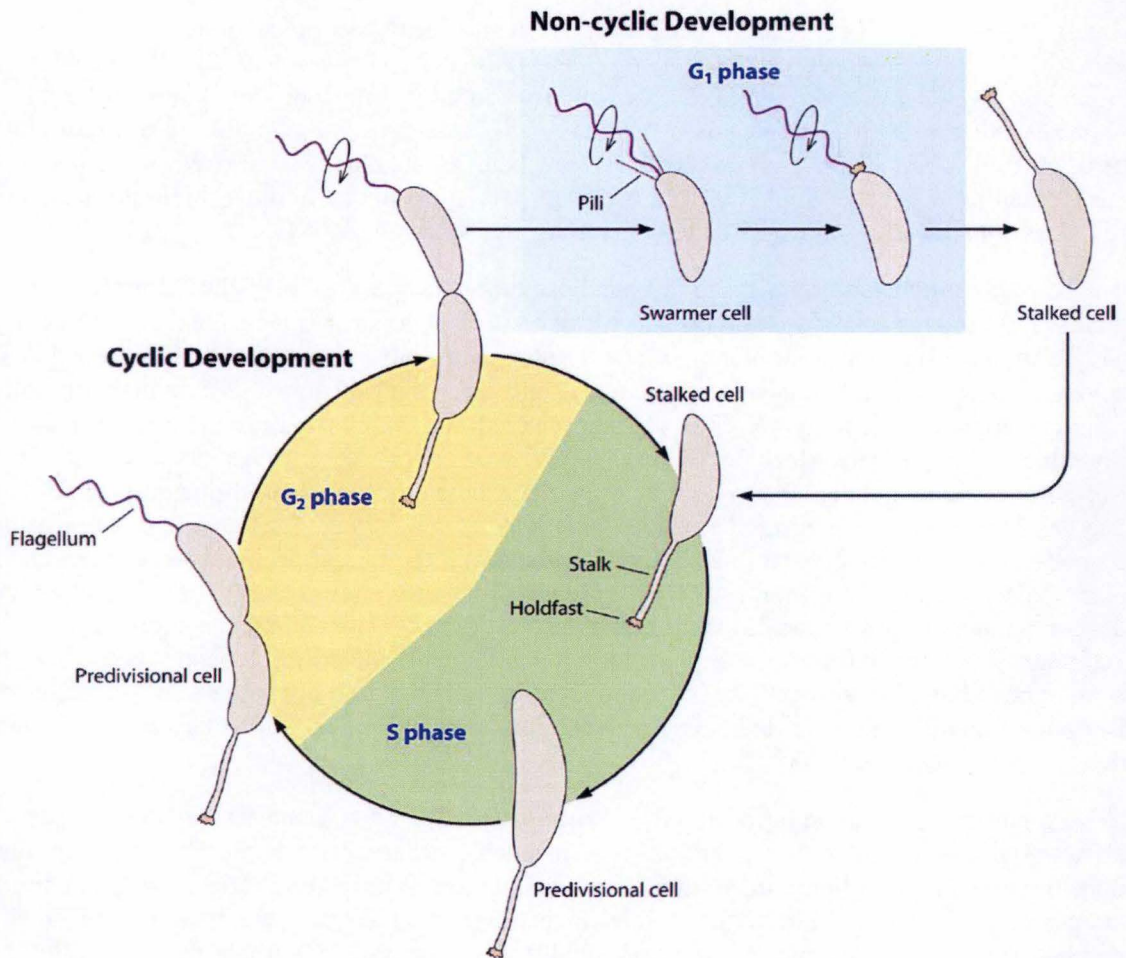


Figure 2: cycle cellulaire de *Caulobacter crescentus*. La cellule pédonculée est capable d'initier son cycle cellulaire et de donner naissance à deux cellules filles fonctionnellement différentes. La cellule flagellée, incapable de répliquer son chromosome, nagera jusqu'à un endroit plus propice où elle se différenciera en cellule pédonculée, terminant ainsi le cycle. (Curtis and Brun, 2010).

1.2.b. α -protéobactéries

Le genre *Brucella* fait partie de la classe des α -proteobactéries dans laquelle on retrouve entre autres *Bartonella*, *Rickettsia*, *Agrobacterium*, *Caulobacter*, *Rhodobacter* ou encore *Sinorhizobium*. Cette classe intéresse beaucoup la communauté scientifique entre autres car elle est suspectée d'être à l'origine de la mitochondrie (Gray et al., 1999). Les différents membres de cette classe semblent partager un certain nombre de caractéristiques : elles ont par exemple un homologue du gène *ctrA*, qui est un régulateur de réponse coordonnant le cycle cellulaire des bactéries, ou encore une division asymétrique (Hallez et al., 2004).

L'exemple le plus frappant de division asymétrique chez les bactéries est *Caulobacter crescentus*. En effet, la division de cette bactérie va donner naissance à deux cellules morphologiquement et fonctionnellement différentes : (1) la cellule pédonculée et attachée au substrat qui pourra recommencer un autre tour de réplication directement après cytokinèse, et (2) une cellule plus petite, flagellée et motile, incapable de répliquer son ADN. La bactérie flagellée pourra réamorcer son cycle cellulaire après différenciation en cellule pédonculée (Figure 2) (Curtis and Brun, 2010). Cette stratégie permet à la cellule flagellée d'échapper à des conditions locales défavorables. Ces caractéristiques, ajoutées au fait qu'il est possible de synchroniser *Caulobacter* dans son cycle cellulaire, font de cette bactérie un outil très puissant et un modèle idéal pour l'étude du cycle cellulaire, de la division asymétrique, de l'asymétrie fonctionnelle et enfin de la différenciation cellulaire chez les bactéries (Curtis and Brun, 2010). *Brucella* étant étroitement apparentée à *Caulobacter crescentus*, cette dernière est souvent utilisée comme modèle dans la recherche sur le cycle cellulaire de *Brucella abortus*.

Brucella fait partie de l'ordre des Rhizobiales avec *Bartonella*, *Agrobacterium* ou encore *Sinorhizobium*. Les différents membres de cet ordre présentent des modes de vie très différents, allant du parasite intracellulaire obligatoire infectant les animaux jusqu'au symbionte de la plante vivant dans le sol. Malgré les différences importantes qui les séparent, les membres de cet ordre partagent certaines caractéristiques, comme la croissance unipolaire (Brown et al., 2011). Il semblerait aussi que la plupart de ces bactéries ont la capacité de vivre en étroite relation avec des cellules eucaryotes (Boussau et al., 2004; Roop et al., 2013). Cette caractéristique pourrait découler de l'ancêtre commun à cette famille. Une étude comparant le génome de *B. suis* à d'autres membres des α -proteobactéries a d'ailleurs montré qu'il était probable que l'ancêtre de cette espèce soit une bactérie du sol associée aux plantes (Paulsen et al., 2002). Cette même étude met aussi en évidence des similarités entre les différents modes d'interaction avec la cellule eucaryote entre *B. suis* (parasite des animaux), *Agrobacterium tumefaciens* (parasite des plantes) et *Sinorhizobium meliloti* (symbionte des plantes) (Paulsen et al., 2002).

2. Infection de l'hôte

2.1. Survie en milieu extérieur

Comme expliqué précédemment, *B. abortus* est un pathogène intracellulaire facultativement extracellulaire. Sa niche de réplication est donc la cellule eucaryote elle-même. Son passage en dehors de l'hôte s'apparenterait plus à une étape de survie obligatoire en attente d'un nouvel hôte à infecter. Selon les conditions, la bactérie pourrait survivre jusqu'à plusieurs mois dans le milieu extérieur en région tempérée. Cependant, la bactérie reste sensible aux hautes températures (58°C

ou plus), rendant l'élimination du pathogène possible par pasteurisation des produits laitiers par exemple (Moreno and Moriyón, 2006).

2.2. Entrée dans l'hôte

Comme mentionné précédemment, *B. abortus* infecte préférentiellement son hôte par voie orale. Une fois le tube digestif atteint, les bactéries sont capables de traverser les épithéliums et d'accéder à la sous-muqueuse via les cellules M. *Brucella* a aussi été décrite comme étant capable d'infecter son hôte en passant directement à travers les muqueuses pharyngées et buccales (Moreno and Moriyón, 2006). Une voie d'entrée alternative se ferait via la conjonctive (Moreno and Moriyón, 2006). Une fois la barrière épithéliale passée, la bactérie serait internalisée par des cellules phagocytaires professionnelles et ensuite transportées à travers l'organisme jusque dans les nœuds lymphatiques (von Bargen et al., 2012). A partir de là, *Brucella* peut rejoindre et se répliquer intensément dans le foie, la rate, ou encore les organes reproducteurs des animaux. Chez l'humain, la bactérie peut infecter efficacement tous les organes (von Bargen et al., 2012).

Chez la femelle gestante, la bactérie peut rejoindre le placenta et finalement le fœtus via les cotylédons. *Brucella* infecte préférentiellement les trophoblastes, probablement car ces cellules produisent de l'érythritol, qui est une source de carbone privilégiée pour *Brucella*. La présence de bactéries dans ces cellules résulte finalement en la rupture du placenta, l'infection du fœtus et menant en définitive à l'avortement (von Bargen et al., 2012).

Chez le mâle, la bactérie rejoint rapidement les testicules, les épидидymes et les canaux spermatisques. La prolifération cellulaire induit une nécrose menant finalement à la stérilité des mâles (Moreno and Moriyón, 2006).

3. Infection cellulaire et trafic

L'infection cellulaire par *Brucella* se fait par un mécanisme encore peu compris et peu décrit. Cependant, il apparaît clair aujourd'hui que les bactéries sont tout autant capables de provoquer leur entrée dans des cellules non phagocytaires que d'être phagocytées par des cellules professionnelles. Chez ces dernières, il semblerait que *Brucella* puisse être internalisée aussi bien de manière dépendante de l'opsonisation qu'indépendante (von Bargen et al., 2012). Il apparaîtrait aussi que l'entrée en cellule puisse passer par des interactions avec les lipids-rafts, bien que ce ne soit pas totalement indispensable pour l'internalisation (Naroeni and Porte, 2002). Cependant, l'entrée dépendante des lipid-rafts semble indispensable à la survie précoce de *Brucella* (Celli, 2006; Naroeni and Porte, 2002; Porte et al., 2003).

Après internalisation, *Brucella* réside dans une vacuole appelée *Brucella* containing vacuole (ou BCV). L'acquisition de différents marqueurs des endosomes précoces dont Rab5 indiquent une interaction au moins transitoire avec ces derniers. A cette étape, la BCV est appelée eBCV (endosomal BCV). Il est aujourd'hui généralement admis que *Brucella* est capable d'interférer avec le trafic intracellulaire pour une bonne maturation de la BCV. Par exemple, il a été démontré que la production de β -1,2-glucan est nécessaire pour éviter la fusion de la vacuole avec les lysosomes, ce qui mènerait à la mort de la bactérie (Arellano-Reynoso et al., 2005; Celli, 2006).

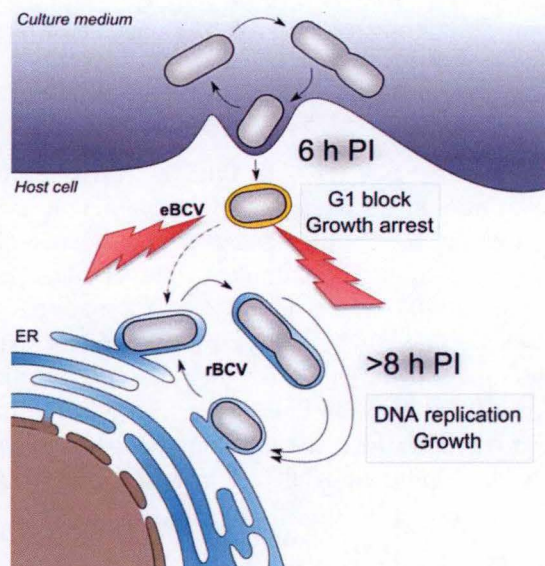


Figure 3: Trafic intracellulaire de *Brucella*. Après l'entrée dans la cellule, *Brucella* prend le contrôle du trafic cellulaire pour la maturation de la BCV. Cette dernière interagira successivement avec les endosomes précoces et tardifs, puis avec la voie sécrétoire et le réticulum endoplasmique. Durant la première étape, qui est censée être particulièrement stressante, les bactéries sont bloquées en G1, et stoppent leur croissance. Elles ne réinitieront leur cycle et leur réplication qu'environ 6 à 8h post-infection (suivant le type cellulaire), dans la rBCV.

Durant la maturation de la eBCV, cette dernière va perdre ses marqueurs des endosomes précoces et en acquérir d'autres, provenant des endosomes tardifs comme LAMP-1 (lysosomal membrane-associated protein-1). Des études ont montré que des interactions transitoires et contrôlées se faisaient entre la vacuole et les lysosomes (Celli, 2015; von Bargen et al., 2012). En effet, des marqueurs de phase fluide ont montré ce type d'interaction, bien que les échanges soient moins importants que lorsque des particules inertes sont utilisées (Starr et al., 2008). Cependant, aucune trace de Cathepsine D, une hydrolase lysosomale, n'a pu être mise en évidence dans la eBCV, indiquant un certain contrôle de ces interactions (Comerci et al., 2001; Pizarro-Cerdá et al., 1998; von Bargen et al., 2012). Cette étape est aussi caractérisée par une acidification du compartiment. Cette acidification serait d'ailleurs un processus nécessaire pour la suite : elle induirait l'expression de l'opéron *virB*, codant pour le système de sécrétion de type IV, qui a été décrit comme étant essentiel pour l'établissement de la niche de réplication (Celli, 2006; Porte et al., 1999; von Bargen et al., 2012). Ces premières heures post infection sont caractérisées par un nombre stable de CFUs (colony forming units), indiquant que les bactéries pourraient être bloquées dans leur cycle cellulaire à cette étape (Comerci et al., 2001).

Selon le type cellulaire, *Brucella* rejoint sa niche de réplication entre 6 et 8 heures après le début de l'infection. Durant cette étape, la BCV subit de profondes modifications et acquiert des marqueurs du réticulum endoplasmique. La BCV est alors appelée rBCV (replicative BCV) (Celli et al., 2003). Cette étape est caractérisée par une augmentation du nombre de CFUs, indiquant que la bactérie se divise (Celli et al., 2003). Un schéma reprenant les différentes étapes est repris en Figure 3.

4. Blocage du cycle cellulaire

4.1. Suivi du cycle cellulaire de *Brucella abortus*

Les premières heures suivant l'infection étant caractérisées par un nombre stable de CFUs (Comerci et al., 2001), notre équipe a voulu déterminer si cela témoignait d'un équilibre prolifération/mortalité ou d'une incapacité de la bactérie à se diviser. Pour ce faire, divers outils de biologie moléculaire ont été mis au point (Deghelt et al., 2014). L'un d'entre eux sera décrit ci-dessous.

Brucella abortus possède deux chromosomes circulaires, appelés chromosomes I et II. Notons que le deuxième (1.2 Mb) est plus petit que le premier (2.1 Mb) et serait dérivé d'un mégaplasme ayant acquis au cours de l'évolution des gènes essentiels (Moreno and Moriyón, 2006), expliquant sa conservation. Cette hypothèse est d'ailleurs appuyée par le fait que le chromosome II porte proportionnellement moins de gènes essentiels que le chromosome I (Jean-François Sternon, données non publiées). Il a été montré que le chromosome I entamait sa réplication avant le chromosome II (Deghelt et al., 2014). Le suivi de la réplication du premier chromosome est donc suffisant pour rendre compte de l'état du cycle cellulaire global de la bactérie. La souche *NoriI* (le N faisant référence au mot anglais « near », donc littéralement marquage du voisinage de l'origine de réplication du chromosome I ou *oriI*) a été construite dans ce but. Elle est caractérisée par la présence d'une séquence *parS*, venant du plasmide pMT1 (*parS*_{pMT1}) de *Yersinia*, qui a été insérée au voisinage de l'*oriI*. Cette séquence est reconnue par une protéine de fusion ParB_{pMT1}-YFP, encodée sur un plasmide pMR10 (*low copy number*). L'observation de deux spots fluorescents par microscopie reflète donc la duplication du site

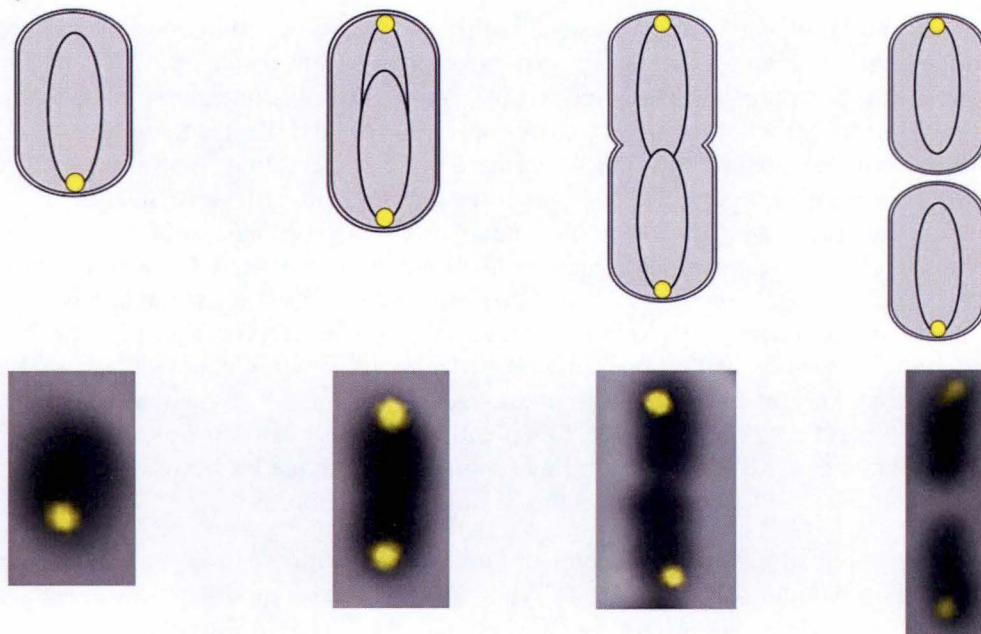


Figure 4 : Représentation Schématique et images microscopiques de *B. abortus* Noril à différents stade de son cycle cellulaire. Lors de la synthèse du chromosome I, les deux séquences $parS_{pMT1}$ ségrégent l'une de l'autre, résultant en deux spots de ParB-YFP distinguables dans la cellule.

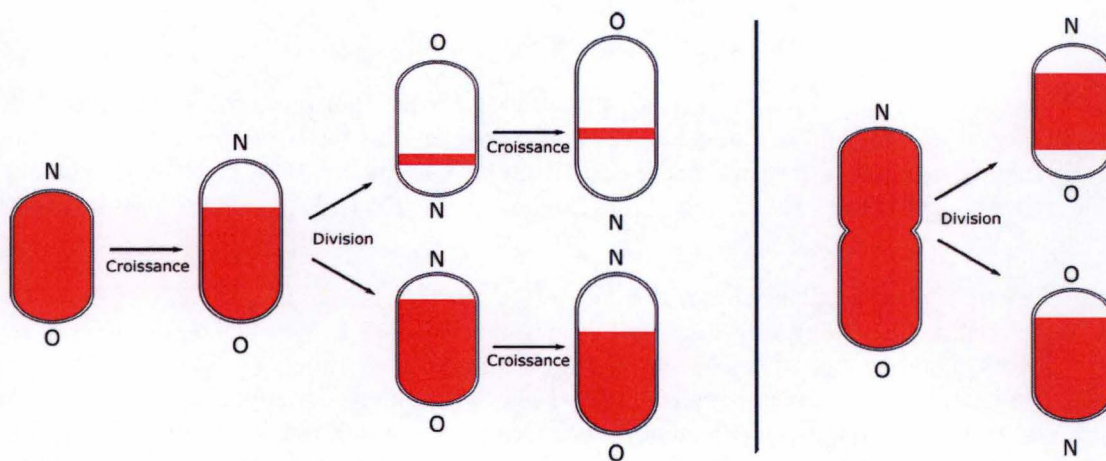


Figure 5: Représentation schématique du marquage au TRSE et de l'incorporation de nouveau matériel non marqué. L'addition de matériel au pôle en croissance (N) après le marquage se traduit par une absence de fluorescence à ce niveau. Lors de la cytokinèse, du matériel est ajouté pour la division, ce qui peut amener une absence de marquage au « vieux pôle » (O) ou au nouveau.

parS_{PMT1}, ce qui indique que la bactérie est soit en phase S ou G2 (2n). A l'opposé, un seul spot correspond à la phase G1 (1n) (Figure 4). Grâce à cet outil, il a aussi été possible de déterminer que l'*oriI* était localisée à l'un des deux pôles de la cellule (Deghelt et al., 2014).

Dans cette étude, la croissance des bactéries a aussi été suivie en utilisant une sonde fluorescente Texas Red couplée à un groupement succinimidyl-ester (TRSE). Ce dernier est capable de réagir avec les groupements amines des protéines. Il en résulte donc un marquage homogène de la membrane externe de *Brucella*. La bactérie poussant de manière polaire, il est possible de distinguer l'intégration de nouveau matériel non marqué au pôle néo-formé (Brown et al., 2011) (Figure 5).

4.2. Enrichissement en G1 et blocage du cycle cellulaire

Grâce à ces outils, il a été possible de caractériser le cycle cellulaire de *B. abortus* durant la phase non-proliférative. *In vitro*, en culture liquide, environ 26% des cellules observables sont en G1. Cependant, 6 heures après le début de l'infection (phase non-proliférative) en cellule HeLa, on remarque un accroissement considérable de cette proportion : 79% des bactéries n'ont qu'un spot visible. Cette observation est aussi valable pour l'infection de macrophages RAW 264.7 (Deghelt et al., 2014). De plus, ils ont observé que durant ce laps de temps, les bactéries ne grandissaient pas : 81% des bactéries sont entièrement marquées au TRSE après 6 heures et n'ont donc pas incorporé de nouveau matériel au pôle. Ces résultats semblent indiquer que les pathogènes entrants sont majoritairement en G1. Pour vérifier cette hypothèse, ils ont observé les bactéries 15 minutes après le début de l'infection. Cette fois encore, ils ont pu retrouver 71% de bactéries en G1, ce qui semble indiquer que ces cellules sont plus infectieuses que les autres. Après la sortie des compartiments positifs pour LAMP-1, c'est-à-dire entre 8 et 12 heures post-infection, les bactéries reprennent leur cycle cellulaire, leur croissance et entament la phase de réplication (Deghelt et al., 2014).

Ensemble, ces données montrent un blocage du cycle cellulaire et de la croissance des bactéries n'ayant pas encore commencé la réplication de leur ADN durant les premières étapes de l'infection. Cependant, l'avantage sélectif de l'arrêt du cycle cellulaire et de la croissance des bactéries en infection n'est pas encore connu.

5. eBCV : une étape stressante

Comme mentionné précédemment, la première étape du cycle infectieux, avant que *Brucella* ne rejoigne sa niche de réplication, semble être particulièrement stressante. En effet, l'interaction de la BCV avec les compartiments de la voie endosomale résulterait en la formation d'un environnement extrême auquel les bactéries doivent faire face (Roop et al., 2013).

L'acidification de la BCV, bien qu'ayant été décrite comme étant nécessaire au bon trafic de *Brucella*, est un stress en soi (Porte et al., 1999; Roop et al., 2013). La bactérie utilise donc différents moyens pour résister à l'acidité du milieu, comme par exemple la chaperonne périplasmique HdeA (Valderas et al., 2005). L'acidité du milieu joue aussi un rôle dans l'activation de certaines enzymes hydrolytiques comme des hydrolases, ou des exo- et endopeptidases, parmi lesquelles on retrouvera par exemple la Cathepsine D (Flannagan et al., 2009). D'autres peptides antimicrobiens, telles que les défensines et les cathélicidines, sont responsables la perméabilisation des membranes plasmique ainsi que de la paroi bactérienne

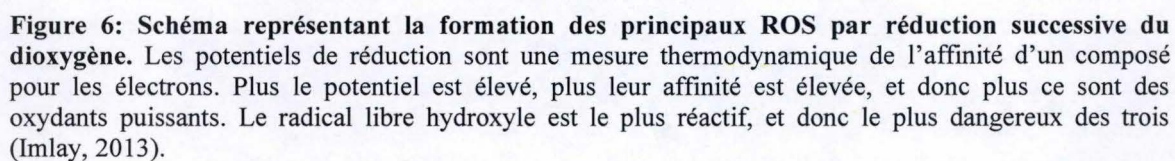
(Flannagan et al., 2009). Bien qu'il ait été mentionné plus haut qu'aucune trace de Cathepsine D n'a pu être mise en évidence dans la eBCV, il est possible que l'interaction de ce compartiment avec les endosomes résulte en un passage, bien que visiblement réduit, d'hydrolases et de peptides antimicrobiens vers la niche de *Brucella* (Roop et al., 2013). Les techniques utilisées ne seraient probablement pas assez sensibles.

Un autre mécanisme de défense mis en place par les cellules phagocytaires est l'appauvrissement du milieu. En effet, certaines protéines insérées dans la membrane des phagosomes sont chargées de diminuer la quantité de nutriments disponibles (Flannagan et al., 2009). C'est typiquement le cas de la protéine NRAMP1 (natural resistance-associated macrophage protein 1), qui transporte des cations comme le Fe^{++} ou le Mn^{++} , qui sont des cofacteurs essentiels pour une série d'enzymes bactériennes (Cellier et al., 2007; Flannagan et al., 2009). Le gradient de H^+ résultant de l'acidification du phagosome serait aussi utilisé comme source d'énergie pour extraire certains nutriments. La cellule sécrète également des protéines capables de séquestrer des nutriments essentiels à la croissance bactérienne comme le fer, dans la lumière du phagosome. C'est typiquement le cas de la lactoferrine (Flannagan et al., 2009; Masson et al., 1969). Il a d'ailleurs été avancé que la niche de réplication finale de *Brucella* serait en étroite relation avec le réticulum endoplasmique pour faire face à la privation en fer (Roop et al., 2013). En effet, l'hème de l'hémoglobine est acheminé dans ce compartiment pour y être dégradé (Taketani, 2005). De plus, il a été montré que *Brucella* possède un transporteur d'hème qui a été identifié comme étant nécessaire à la mise en place d'une infection chronique dans la rate (Paulley et al., 2007; Roop et al., 2013). Chez *E. coli*, il a aussi été montré que la famine pouvait mener à un stress oxydatif. En effet, la bactérie ne peut plus renouveler le pool de molécules biologiques telles que les protéines ou l'ADN, ce qui mènerait au final à une accumulation des dommages oxydatifs (Dukan and Nyström, 1998).

Il faut aussi noter que la lumière du phagosome est un milieu pauvre en O_2 (James et al., 1995; Loisel-Meyer et al., 2005). *Brucella* a donc mis en place différentes stratégies pour faire face à la privation en oxygène comme l'utilisation de complexes assurant la respiration même à faible concentration en oxygène (Loisel-Meyer et al., 2005; Roop et al., 2013), ou encore en utilisant un accepteur final d'électrons autre que l'oxygène (Kohler et al., 2002).

Un autre stress potentiellement rencontré est la production de dérivés réactifs de l'azote (RNS) par l'oxyde nitrique synthase. L'oxyde nitrique (NO^\cdot) généré peut ensuite subir diverses modifications, menant à la formation d'une vaste gamme de produits (Flannagan et al., 2009). L'un des plus remarquables est la formation de peroxynitrite (ONOO^-) par réaction avec l'anion superoxyde (voir ci-dessous) (Roop et al., 2013). Le peroxynitrite est considéré comme étant un agent important dans l'élimination de pathogènes (Fang, 2004).

Enfin, une stratégie de défense bien connue est le *burst* oxydatif, menant à la formation de dérivés réactifs de l'oxygène, toxiques pour la bactéries (voir ci-dessous) (Dupre-Crochet et al., 2013).



6. Le stress oxydatif

6.1. Production de dérivés réactifs de l'oxygène

Lors de l'émergence de la vie sur terre, les conditions étaient très différentes d'aujourd'hui ; entre autres, l'atmosphère était réductrice. L'apparition de l'oxygène sur terre n'est arrivée que plus tard, lors de l'émergence des organismes photosynthétiques (Shaw, 2008). Le problème est que l'O₂ est une molécule réactionnelle, qui peut provoquer de nombreux dommages. De plus, l'oxygène étant une molécule apolaire, elle diffuse facilement à travers les membranes. Il en résulte qu'il n'est pas possible de mettre en place des mécanismes visant à baisser la concentration intracellulaire en O₂. Les organismes ont donc dû soit s'adapter en ne vivant que dans des endroits dépourvus d'oxygène, soit en mettant en place des mécanismes pour faire face aux dérivés réactifs de l'oxygène, ou ROS (*reactive oxygen species*) (Imlay, 2013).

L'oxygène en lui-même ne réagit que difficilement avec les composants principaux du vivant. Cependant, il est capable d'oxyder de bons donneurs d'électrons dans la cellule, typiquement les enzymes de la chaîne respiratoire, des flavoprotéines, ou encore les centres métalliques par exemple. Cette réduction de l'oxygène mène à la formation de l'anion superoxyde (O₂⁻), qui est une espèce beaucoup plus réactionnelle et donc beaucoup plus dangereuse que l'oxygène. Deux réactions d'oxydoréduction mènent successivement à la formation de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et du radical libre hydroxyle (OH·). Ce dernier a été décrit comme étant le plus réactionnel, et donc le plus dangereux des trois (Dizdaroğlu et al., 1991; Imlay, 2013). Ces réactions sont montrées à la Figure 6. Le potentiel de réduction est une mesure de l'affinité des composés pour les électrons. Plus le potentiel est élevé, plus ils auront tendance à accepter des électrons, et donc plus ils seront des oxydants puissants. Par exemple, le potentiel de réduction du radical libre hydroxyle (2,33 V) étant bien supérieur à celui du peroxyde d'hydrogène (0,38 V), l'OH· est donc un bien meilleur oxydant que l'H₂O₂. Il est important de noter que l'ensemble des ROS ne se limite pas à ces trois espèces, il en existe de nombreuses autres. Cependant, ce sont les plus abondantes et qui ont la plus grande importance au niveau des dégâts occasionnés à la cellule (Imlay, 2013).

La génération des ROS via le *burst* oxydatif est une réponse immunitaire bien connue. En effet, ces espèces sont hautement toxiques et ont été décrites comme étant bactéricides (Dupre-Crochet et al., 2013). La formation des ROS, et plus particulièrement l'O₂⁻, par la cellule en tant que défense est principalement due à la NADPH oxydase. C'est une enzyme membranaire, composée de deux protéines intégrales qui, suite à certains stimuli, s'assemblent pour former une enzyme fonctionnelle. Cette protéine étant localisée en membrane plasmique, on la retrouve dans les membranes des phagosomes, ces derniers pouvant être par après enrichis en NADPH oxydase par fusion avec d'autres vacuoles (Dupre-Crochet et al., 2013). La cellule hôte est donc capable d'augmenter la concentration en anion superoxyde dans les phagosomes. Cette molécule étant chargée négativement, elle ne peut pas traverser les membranes par diffusion. Ici encore, l'acidification de la vacuole joue un rôle : le transport d'ions H⁺ dans la lumière du phagosome contrecarre les charges négatives apportées par l'anion superoxyde, facilitant ainsi sa génération (Flannagan et al., 2009).

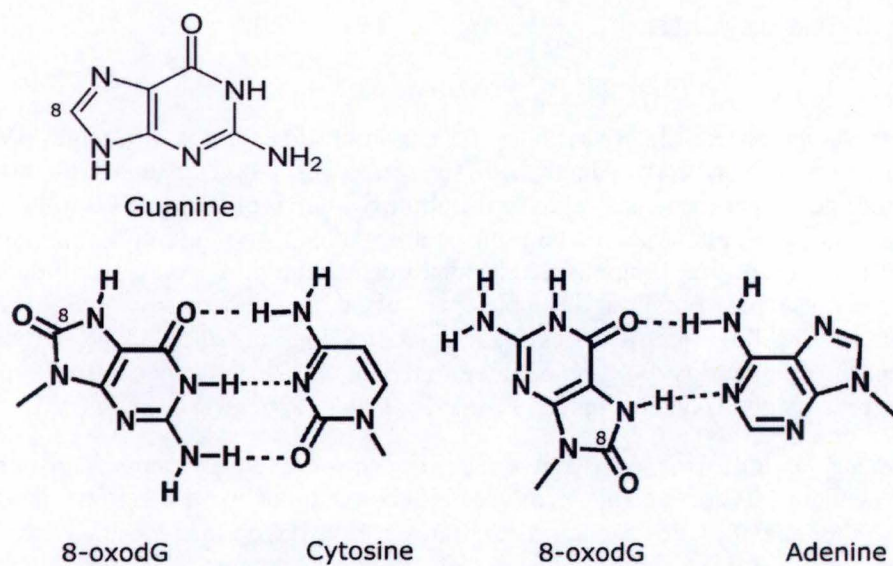


Figure 7: Représentation schématiques de la guanine et du 8-oxodG. Le 8-oxodG est capable de s'apparier à la fois à la cytosine et à l'adénine. Le 8 représente la position du carbone oxydé. (Adapté de Kamiya, 2003)

6.2. Elimination des ROS

Pour faire face aux ROS, les organismes ont dû sélectionner des mécanismes leur permettant de les éliminer. Les anions superoxyde étant plus dangereux que le peroxyde d'hydrogène, l'évolution a permis la sélection d'une enzyme capable de catalyser la dismutation de ces anions en peroxyde d'hydrogène : la superoxyde dismutase (SOD). Deux SOD ont été recensées chez *Brucella*. Une SOD cytoplasmique (MnSOD, SodA) et une SOD périplasmique (Cu-ZnSOD, SodC). La SOD périplasmique serait donc importante pour la bactérie pour faire face à un stress exogène, en opposition à la SOD cytoplasmique qui jouerait un rôle face à une production endogène d'O₂⁻ (Roop et al., 2013). Chez *E. coli*, il a d'ailleurs été montré que seul l'enzyme cytoplasmique est synthétisé de manière constitutive, ce qui semble logique car la production d'anion superoxyde par le métabolisme est continue, contrairement à un stress exogène qui serait transitoire (Imlay, 2013).

Si l'H₂O₂ est l'espèce la moins réactionnelle et donc la moins dangereuse des trois, il reste néanmoins important de l'éliminer car la réduction de cette dernière mène à la formation de radicaux libres OH[·], qui eux sont extrêmement dangereux pour la cellule. C'est d'autant plus vrai que l'action de la superoxyde dismutase mène à la formation d'H₂O₂. *Brucella* encode différentes enzymes pour pallier à ce problème. D'une part la catalase KatE menant à la formation d'O₂ et d'eau et d'autre part la peroxydase AhpC, capables de catalyser l'oxydation de NADH et de réduire le peroxyde d'hydrogène en eau (Imlay, 2013; Roop et al., 2013). Cette dernière est une enzyme exprimée en routine (Roop et al., 2013). Cependant, chez *E. coli*, il a été montré que lors d'un stress fort ou de famine, la production de NADH n'est plus suffisante, et il faut faire appel à un autre système : les catalases, qui ont un mode d'action différent. En effet, la réaction se déroule en deux étapes, et il faut deux molécules d'H₂O₂ successives pour terminer le processus. Après la première, l'enzyme possède en son site actif un résidu ferryl/radical, qui est un oxydant potentiel. Si les concentrations en ROS ne sont pas suffisantes, il est donc possible que ce groupement ferryl/radical réagisse avec une autre molécule, causant au passage des dommages oxydatifs. C'est pourquoi les catalases pourraient ne pas être appropriées lorsque les concentrations en H₂O₂ sont trop faibles, et sont complémentaires aux peroxydases (Imlay, 2013).

6.3. Dommages occasionnés

Les dommages occasionnés par un stress oxydatif peuvent être nombreux, et toucher un grand nombre de molécules biologiques différentes. Les centres métalliques, que l'on retrouve fréquemment dans les sites actifs des enzymes sont souvent la cible d'oxydation, inactivant la protéine. Citons par exemple les centres fer-soufre (4Fe-4S) des déhydratases, ou encore certaines enzymes utilisant un atome de fer comme groupement prosthétique. Les résidus cystéines et méthionines des protéines, ainsi que les lipides sont aussi possiblement attaqués par les ROS (Imlay, 2013). Les membranes lipidiques et leurs protéines sont donc particulièrement sensibles à l'oxydation (Arts et al., 2015).

Une autre famille de molécules endommagées par les dérivés réactifs de l'oxygène sont les acides nucléiques. Comme mentionné précédemment, des trois ROS évoqués, seul le radical libre hydroxyle peut réagir avec l'ADN (Imlay, 2013) et peut occasionner de nombreux dégâts différents, affectant aussi bien les bases que le déoxyribose. Cependant, la lésion la plus fréquemment observée est la formation de 8-oxodéoxyribo-guanine (8-oxodG, Figure 7) par oxydation de la guanine directement dans l'ADN ou dans les formes libres du cytoplasme

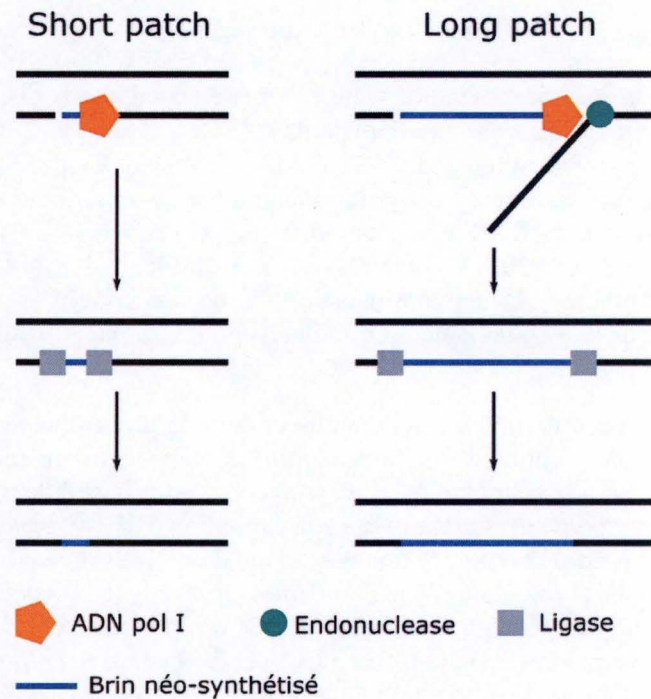


Figure 8: Différence entre short patch et long patch dans le mécanisme du BER. Le short patch est caractérisé par le remplacement du seul nucléotide endommagé par l'ADN Pol I. Dans le long patch, une dizaine de nucléotides sont synthétisés à partir du site abasique, le brin déplacé par la polymérase est ensuite clivé par une endonucléase. La lésion est finalement réparée par une ligase.

(Dizdaroglu et al., 2002). Si la base guanine est plus fréquemment endommagée que les autres, c'est parce qu'elle a un potentiel de réduction plus bas, ce qui fait d'elle un meilleur donneur d'électron, donc un bon réducteur (Candeias and Steeden, 1993). La guanine peut donc agir comme réparateur : elle peut réduire une base oxydée en s'oxydant elle-même, réparant la lésion au passage (Candeias and Steeden, 1993). Le dommage final se situera donc au niveau de la guanine (Imlay, 2013). Le problème majeur du 8-oxodG est qu'il s'apparie préférentiellement à l'adénine, même si des liaisons cytosine-8-oxodG sont toujours possibles (Li, 2010). Si ces dégâts ne sont pas réparés, des mutations peuvent apparaître. En effet, lors de la réplication de l'ADN, si une adénine s'apparie avec le 8-oxodG du brin guide, il y aura transversion C·G → A·T. Au contraire, si le 8-oxodG s'apparie à une adénine du brin guide, il y aura transversion A·T → C·G.

7. Systèmes de réparation de l'ADN

Les dommages à l'ADN peuvent être réparés de diverses manières. Ici, nous nous focaliserons sur la réparation des lésions oxydatives par la voie de *base excision repair* (BER), mais bien sûr il existe de nombreux autres systèmes de réparation de l'ADN comme le *nucleotide excision repair* (NER), ou la réparation par recombinaison homologue (Dizdaroglu, 2005).

7.1. Base excision repair

La voie du BER consiste globalement en l'excision de la base puis du sucre et finalement le remplacement du nucléotide.

La première étape est assurée par une ADN glycosylase, qui va hydrolyser le lien glycosidique entre le sucre et la base, laissant un site abasique. Ensuite, le lien phosphodiester est clivé, généralement par une endonucléase apurinique/apyrimidinique (AP endonucléase), laissant des extrémités 3'-hydroxyle et 5'-deoxyribose-phosphate (van der Veen and Tang, 2015). Cependant, certaines enzymes dotées d'une activité AP lyase sont capables de réaliser ces deux étapes. Les extrémités générées seront néanmoins différentes : 3'- α,β -aldéhyde insaturé et 5'-phosphate (Dizdaroglu, 2005). Ici, il existe deux possibilités nommées *short patch* ou *long patch*. Dans le premier cas, l'ADN polymérase I remplace le seul nucléotide manquant en s'aidant du brin guide. Dans le second cas, l'ADN polymérase I remplace une dizaine de nucléotides, et le morceau déshybridé est ensuite clivé par une endonucléase. La lésion est enfin définitivement réparée par une ligase (Figure 8) (van der Veen and Tang, 2015).

7.2. Système MutM MutY MutT

Le système MutM MutY MutT est un ensemble de trois protéines agissant en synergie et intervenant dans la réparation de dommages spécifiques au stress oxydatif, et plus particulièrement le 8-oxodG (Fowler et al., 2003).

MutM (aussi appelée formamidopyrimidine-DNA glycosylase) est une ADN glycosylase qui possède l'activité AP lyase (Graves et al., 1992). Elle est capable de spécifiquement reconnaître la configuration 8-oxodG·C, et de remplacer la base endommagée par une guanine. Si cette lésion n'est pas réparée, elle peut donner lieu, après réplication de l'ADN, à des mésappariements entre une adénine et un 8-oxodG, et finalement induire des transversions C·G → A·T (Fowler et al., 2003; Li, 2010). MutM étant incapable de reconnaître et de réparer le mésappariement 8-

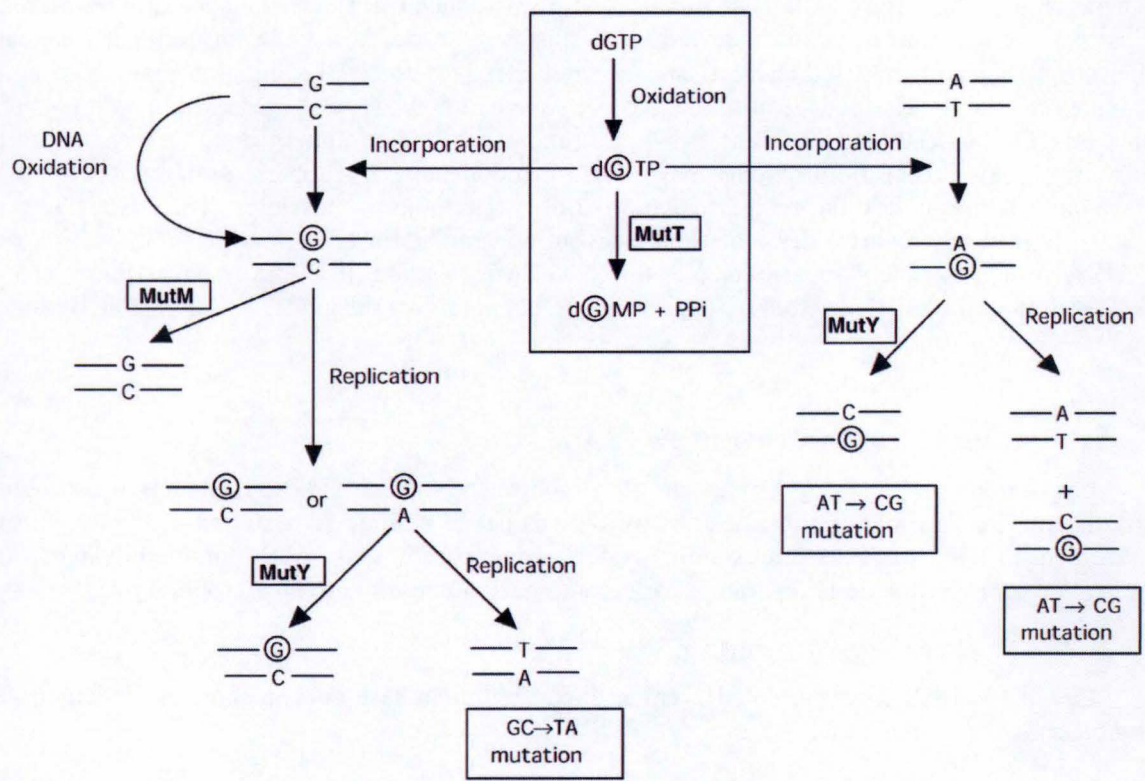


Figure 9: Représentation schématique de l'action des différents acteurs du système MutM MutY MutT et des différents cas de figures pouvant être rencontrés. Le 8-oxodG est représenté par un G entouré (Imley, 2013).

oxodG·A, cette fonction est assurée par MutY, qui est capable d'exciser l'adénine qui sera ensuite remplacée par une cytosine. On retrouve donc la configuration 8-oxodG·C reconnue et pouvant être réparée par MutM (Fowler et al., 2003). Au vu de ce système, on constate que MutY est une enzyme à double tranchant. En effet, elle peut induire des mutations. Si le brin guide contient un A, et que le 8-oxodG vient s'apparier à celui-ci, MutY reconnaît cette configuration, « répare » cette lésion, ce qui au final donne lieu à une transversion A·T→C·G (Fowler et al., 2003). Il a d'ailleurs été montré que l'expression de MutY était diminuée lors de l'induction d'un stress oxydatif chez *Escherichia coli*, ce qui pourrait montrer que c'est une enzyme fonctionnant en synergie avec MutM en condition normale, mais qu'elle induirait trop de mutations lors d'un stress fort (Yoon et al., 2003). Le dernier acteur de ce système est MutT. Contrairement aux deux autres, ce n'est pas une ADN glycosylase. Cette protéine intervient en amont des deux autres, c'est-à-dire avant l'intégration de la base endommagée dans le génome. En effet, cette enzyme est capable de reconnaître les 8-oxodGTP libres et de les hydrolyser en 8-oxodGMP, une forme qu'il n'est plus possible d'intégrer dans l'ADN (Fowler et al., 2003). La Figure 9 reprend les fonctions de ces trois protéines, ainsi que l'ensemble des cas et des mutations possibles.

Objectifs

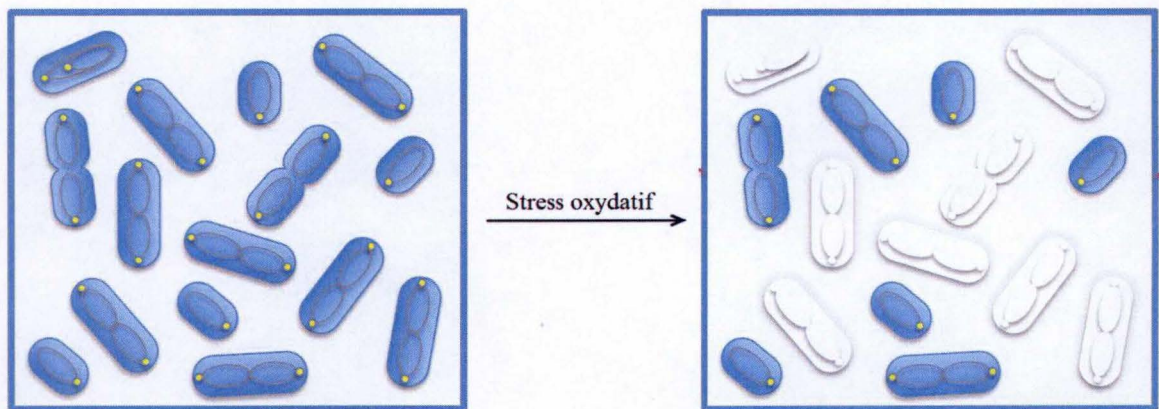


Figure 10: Hypothèse selon laquelle les G1 seraient sélectionnées par mort des cellules ayant initié la réplication de leur ADN lors d'un stress oxydatif. Les cellules grisées sur la droite du schéma représentent les bactéries mortes.

Objectifs

1. Hypothèse

Nous avons vu que le cycle infectieux de *B. abortus* était scindé en deux grandes parties : la phase d'invasion et de *trafficking*, et la phase de réplication. Deghelt *et al.* (2014) ont montré que les bactéries ne répliquant pas leur ADN (G1) semblaient plus invasives que les autres. De plus, ils ont mis en évidence un blocage du cycle cellulaire et de la croissance de *Brucella* durant la première phase. Il est donc fort probable que le fait d'être en G1 soit un avantage pour *Brucella*, ce qui a permis la sélection de ce stade particulier pour l'infection lors de l'évolution. Cependant, la nature de l'avantage sélectif n'est pas encore connue.

Comme le trafic dans des compartiments endosomiaux s'accompagne probablement de stress, on peut donc émettre l'hypothèse que le fait d'être en G1 conférerait un avantage pour faire face à ces différents stress. Or, ce qui caractérise une bactérie en G1 est l'absence de réplication de l'ADN. De plus, nous avons vu que certains stress, et en particulier le stress oxydatif, peuvent mener à des lésions à l'ADN. Il serait donc possible que les bactéries bloquent leur cycle cellulaire pour faire face à ces stress, et pour prendre le temps de réparer les dommages occasionnés à son ADN avant de commencer la réplication. Dans ce travail, nous nous intéresserons plus particulièrement au stress oxydatif et son effet sur le cycle cellulaire. Nous tenterons également de déterminer le rôle joué chez *B. abortus* par le système homologue aux protéines MutM, MutY et MutT décrites pour *E. coli*.

2. Méthodologie

2.1. Stress oxydatif et cycle cellulaire

Pour la première partie de ce mémoire, nous avons voulu déterminer si le fait d'être en G1 pouvait être un avantage pour *Brucella* confrontée à un stress oxydatif. La synchronisation de *B. abortus* n'étant pas possible, à l'inverse de *C. crescentus*, nous n'avons pas pu directement tester les différences de sensibilité au stress oxydatif entre les différents stades du cycle cellulaire. Nous avons donc utilisé une méthode indirecte. Si le fait d'être en G1 est un avantage pour faire face au stress oxydatif, il serait donc peut-être possible de voir un accroissement de la proportion de ces bactéries lors d'un stress, soit par élimination des cellules répliquant leur ADN (**Figure 10**), soit par modification du cycle cellulaire en faveur des G1 (par exemple par un délai de la transition G1/S). Nous avons donc utilisé la souche *NoriI* pour caractériser la proportion de G1 après un stress oxydatif.

2.2. Caractérisation du système MutM MutY MutT

La deuxième partie de ce mémoire concerne la caractérisation des souches délétées pour le système MutM MutY MutT face au stress oxydatif et en infection. Le but de cette partie du projet est de déterminer si ce système de réparation de dommages oxydatifs causés à l'ADN est crucial pour la survie en milieu stressant et en infection cellulaire.

Résultats

Résultats

1. Proportion de *Brucella* en G1 cellulaire lors d'un stress oxydatif

1.1. Approche

Comme nous l'avons expliqué dans les objectifs, nous avons émis l'hypothèse que le stade G1 pourrait constituer un avantage pour faire face à différents stress potentiellement rencontrés durant les premières heures suivant l'infection. La synchronisation de *Brucella* n'étant actuellement pas possible, il n'a pas été possible de comparer directement les différences de sensibilité au stress oxydatif entre des bactéries à différents stades de leur cycle cellulaire. Nous avons donc dû utiliser une stratégie différentes et plus indirecte : si le fait d'être en G1 constitue réellement un avantage pour la bactérie lorsqu'elle est soumise à un stress, il serait donc éventuellement possible de voir un enrichissement en ce stade particulier dans une population stressée. Ceci pourrait être dû soit à la sélection du stade G1 par la mort des autres bactéries, soit à une réponse adaptative de la bactérie au stress. Nous avons donc repris la souche *NoriI* présentée précédemment (Deghelt et al., 2014). Elle nous a permis de déterminer la proportion de bactérie en G1 dans une population, et de comparer des échantillons soumis à un stress oxydatif avec une population dans des conditions de culture normale. Un travail mené par Katy Poncin a déjà montré une augmentation de la proportion de bactéries en G1 après l'induction d'un stress alkylant, en présence de méthyl-methanesulfonate (MMS). Il faut noter à ce stade que cette augmentation de la proportion en G1 n'est observable que lorsque le stress est suffisamment important que pour induire une chute de 1 log au niveau des CFUs (données non publiées).

Dans ce travail, nous avons utilisé deux agents pour l'induction d'un stress oxydatif. D'une part le peroxyde d'hydrogène, dont nous avons déjà discuté précédemment, et d'autre part le paraquat. C'est un puissant agent rédox cyclique. Ceci signifie que le paraquat est capable d'arracher des électrons à un réducteur suffisamment fort, comme des flavoprotéines par exemple. Cette forme réduite du paraquat est ensuite capable de réduire le dioxygène, menant à la formation de l'anion superoxyde. Le paraquat est à cette étape revenu à son état d'origine, et prêt à entamer un nouveau cycle (Chang et al., 2013; Murphy and Cocheme, 2009). L'anion superoxyde ne passant pas les membranes, et étant donné le mécanisme d'action du paraquat, le stress doit en théorie être induit en intracellulaire. Il faut tout de même noter que l' O_2^- est rapidement dismuté en H_2O_2 . S'il n'a jamais clairement été montré comment le paraquat entre dans les bactéries, de nombreux travaux ont montré que cet agent avait effectivement clairement un effet sur la croissance bactérienne en conditions aérobies (Hassan and Fridovich, 1978). Différents autres résultats obtenus chez *E. coli* tendent à montrer que cet effet est dû à la production de dérivés réactifs de l'oxygène, comme par exemple une mesure de l'augmentation de la concentration en peroxyde d'hydrogène dans une solution bactérienne contenant du paraquat (Liu and Imlay, 2013), la consommation d'oxygène même en présence d'un agent bloquant la chaîne de transport des électrons (Hassan and Fridovich, 1979) ou encore l'hypersensibilité de mutants délétés pour la Mn-SOD ou la Fe-SOD superoxyde dismutase face au paraquat (Carlioz and Touati, 1986).

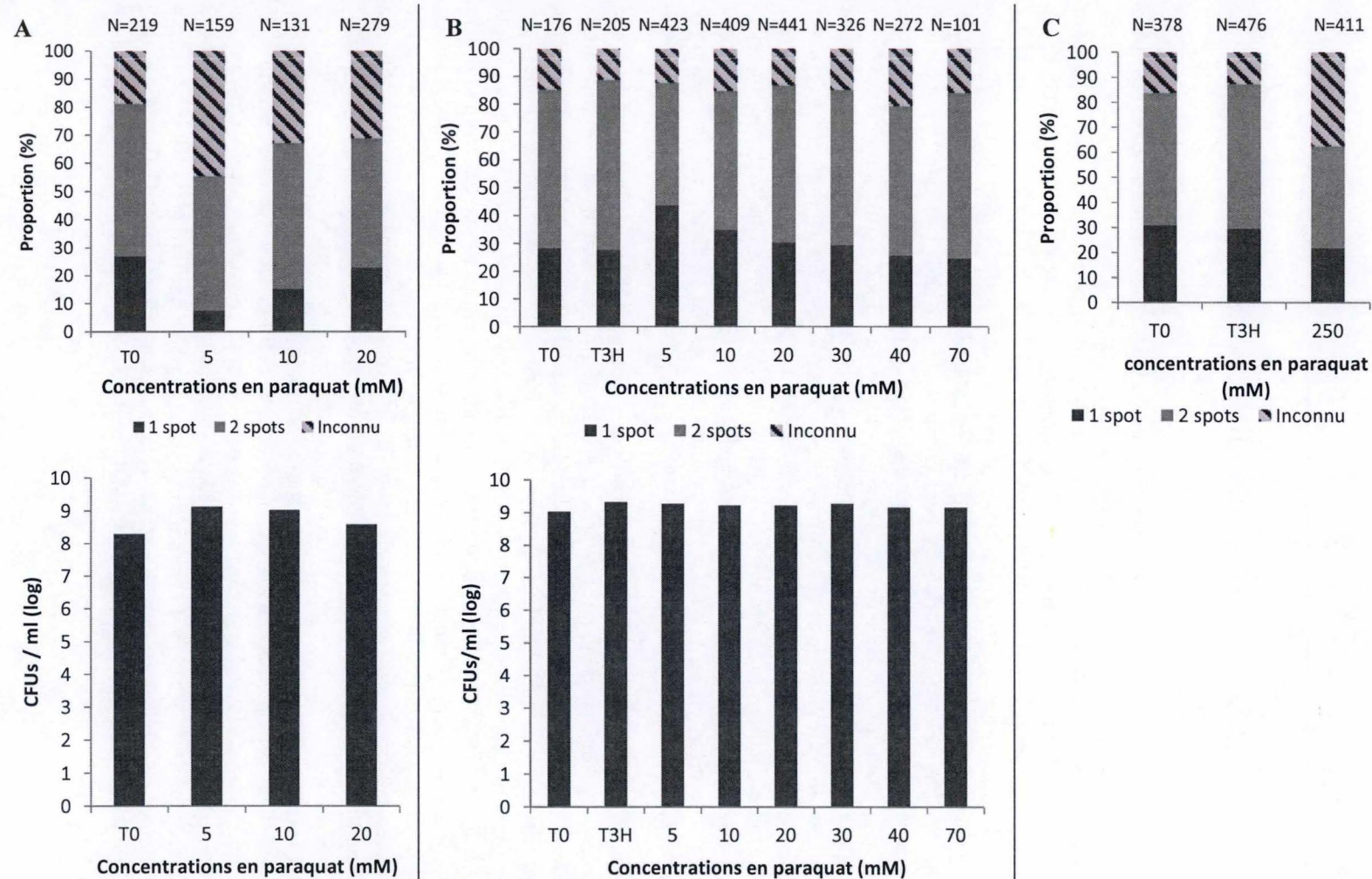


Figure 11: Proportion de G1 après stress induit par le paraquat. La proportion de G1 et G2/S a été déterminée grâce à la souche *Noril* par microscopie. (A) et (B) représentent les différents tests de concentration, avec les CFUs correspondants en bas. T0 et T3H représentent les deux contrôles : la population avant le début de l'expérimentation, et la population après les 3 heures d'incubation sans agent stressant. (C) représente la somme du triplicat réalisé.

1.2. Stress induit par le paraquat

Différentes concentrations en paraquat, un générateur d'anions superoxyde (5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 70 mM et 250 mM), ainsi que différents temps de stress (3 et 6 heures) ont été testés. Dans le cas du paraquat, le stress a été induit dans du 2YT. Les bactéries *NoriI* ont ensuite été observées au microscope à fluorescence, et des comptages ont finalement été réalisés pour déterminer la proportion de *Brucella* ne répliquant pas leur ADN (G1, 1 spot), et des autres (G2/S, 2 spots). Plusieurs contrôles ont été réalisés. D'une part, dans une population non stressée (temps 0 et temps 3 heures), la proportion de G1 attendue se situe aux alentours de 27% (Deghelt et al., 2014). D'autre part, des CFUs ont été réalisés pour évaluer la viabilité et la capacité des cellules à se diviser après le stress.

Les résultats obtenus au cours des différentes expériences n'ont pas permis de montrer une augmentation de la proportion de G1 suite à un stress induit par le paraquat. Dans un premier temps, les résultats obtenus semblaient même indiquer le contraire : une diminution de la proportion de bactéries ne répliquant pas leur ADN dans les plus basses concentrations testées (5 mM). Cette tendance semble revenir à la normale lors de l'augmentation des concentrations en agent oxydant (Figure 11.A). Cependant, il faut noter que la proportion de bactéries pour lesquelles il n'est pas possible de déterminer le nombre de spots est élevée (jusqu'à 44,7%), rendant ces résultats difficilement interprétables.

Lors de la répétition de l'expérience, la tendance exactement inverse a été observée : un accroissement en G1 suivi d'un retour à la normale lors de l'augmentation des doses en paraquat. Lors de ces tests, aucune chute des CFUs n'a pu être observée. Nous avons donc décidé d'investiguer une concentration plus haute en paraquat. De plus, nous avons aussi testé un temps d'induction du stress plus long (6 h). Une fois encore, aucune accumulation en G1 n'a pu être mise en évidence, et aucune chute au niveau des CFUs n'est observable (Figure 11.B).

Une haute concentration en paraquat a été testée et cette expérience a été répétée trois fois pour confirmer les résultats. Encore une fois, la proportion de G1 dans la population stressée ne semble pas affectée par un tel stress. Cependant, à ces doses en agent stressant, la proportion de cellules pour lesquelles il n'est pas possible de déterminer le nombre de spots est très élevée (Figure 11.C). Une fois de plus il faut noter l'absence de chute au niveau des CFUs entre la condition stressée et non stressée.

1.3. Stress induit par le peroxyde d'hydrogène

Dans un deuxième temps, nous avons utilisé le peroxyde d'hydrogène comme agent stressant. Dans ce cas, le stress est exogène. Nous avons donc utilisé ce dérivé réactif de l'oxygène pour déterminer si le blocage en G1 n'était pas dépendant de l'endroit et de la nature du stress.

Comme pour le paraquat, différentes concentrations en peroxyde d'hydrogène ont été testées. Le H_2O_2 pouvant potentiellement réagir avec des éléments du milieu liquide 2YT, nous avons induit le stress dans du PBS, comme c'est souvent le cas dans la littérature (Fan et al., 2015).

Lors de la première expérimentation, nous avons testé des concentrations allant de 30 à 100 mM en H_2O_2 . Si aucune augmentation de la proportion en G1 n'a pu être mise en évidence dans

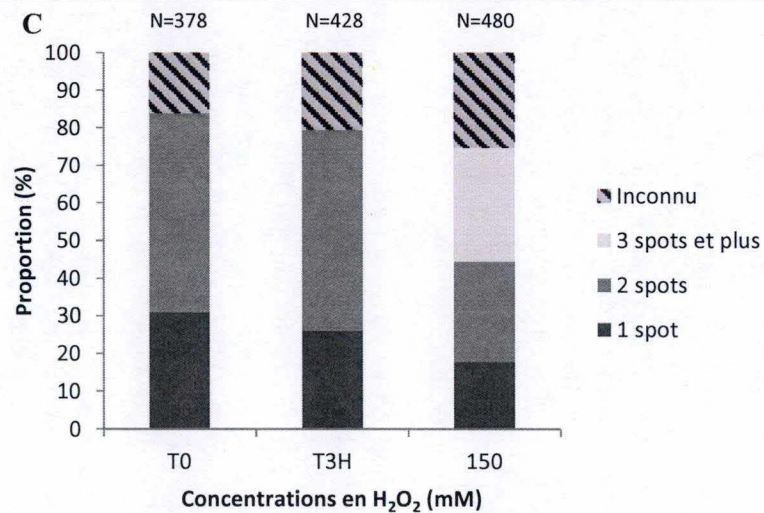
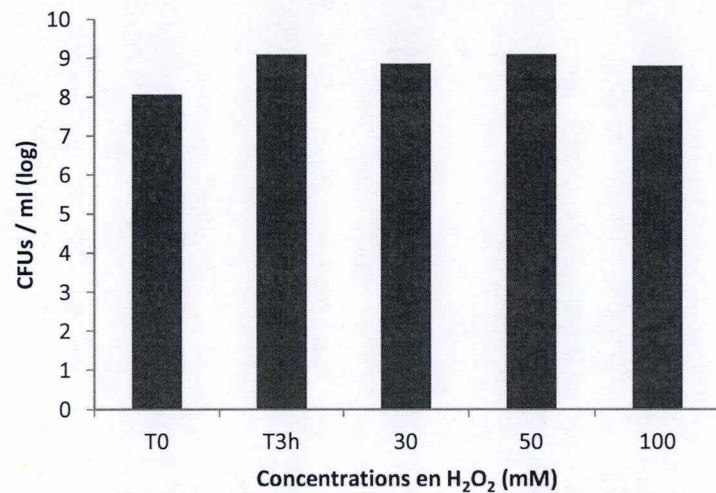
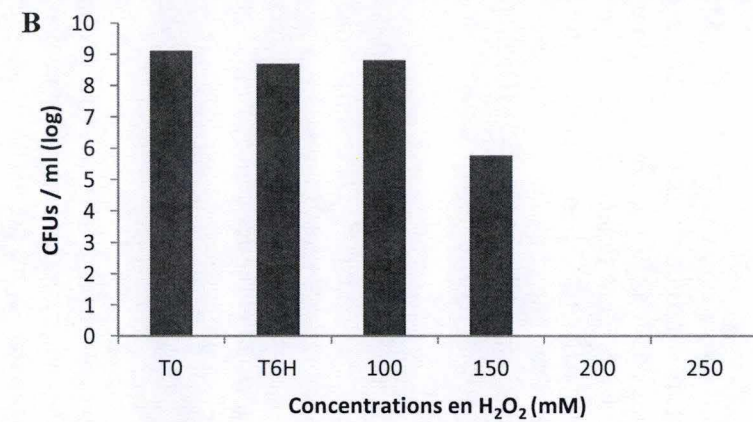
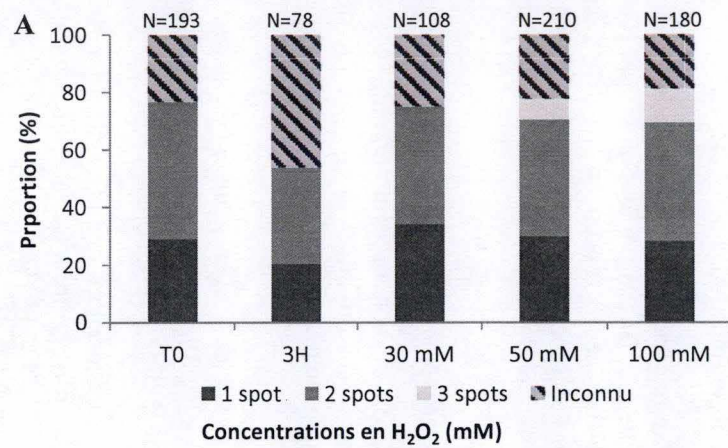


Figure 12: Proportion de G1 et G2/S après stress induit à l' H_2O_2 . La proportion de G1 et G2/S a été déterminée grâce à la souche *NoriI* par microscopie. (A) représente les premiers tests de concentrations réalisés, (B) la chute de CFUs observée à une concentration de 150 mM et (C) représente la somme du triplicat réalisé. T0 et T3H représentent les deux contrôles : la population avant le début de l'expérimentation, et la population après les 3 heures d'incubation sans agent stressant.

ce test, nous avons pu remarquer l'apparition d'une quantité non négligeable (jusqu'à 11,7%) de bactéries présentant une quantité anormale de spots : jusqu'à 6 spots (Figure 12.A).

L'exposition de *Brucella* à 100 mM de peroxyde d'hydrogène ne semblant pas affecter les CFUs, nous avons ensuite testé des concentrations allant jusqu'à 250 mM. A une concentration de 150 mM, les CFUs sont diminuées d'environ un log par rapport au contrôle (Figure 12.B), ce qui correspond à la chute de CFUs observée lors de l'accumulation en G1 avec le stress alkylant (Katy Poncin, non-publié). Nous avons donc décidé de répéter cette expérience trois fois. Si aucune augmentation de la proportion en G1 n'est observable, environ 30% des bactéries présentent un nombre anormal de spots (Figure 12.C).

Le nombre anormal de spots observés dans des cellules stressées à l' H_2O_2 nous a amené à nous poser des questions quant à la quantité d'ADN contenue dans ces cellules. De la cytométrie de flux a donc été réalisée sur des échantillons stressés. De manière intéressante, nous avons pu remarquer que si ces bactéries semblent présenter un nombre d'origine de répllication anormal, la quantité d'ADN dans cette population est tout à fait similaire au contrôle (Figure 13).

2. Caractérisation des délétants pour le système MutM MutY MutT

Un certain nombre de stress rencontrés par *Brucella* dans la eBCV pouvant potentiellement causer des dommages à l'ADN, nous avons avancé l'hypothèse que la bactérie stoppe son cycle cellulaire en G1 durant cette étape pour prendre le temps de réparer son ADN. Nous intéressant particulièrement au stress oxydatif, nous avons donc voulu voir si un système de réparation de dommages spécifiques au stress oxydatif pouvait être impliqué dans la résistance à ce stress. Nous avons donc choisi le système MutM MutY MutT.

Nous avons donc construit différentes souches délétées pour un, deux, ou les trois acteurs de ce système. Pour ces souches délétantes, la majorité du gène a été retiré, incluant les domaines importants au fonctionnement de la protéine. $\Delta mutM$ excepté, les 5 à 15 derniers et premiers codons ont été laissés en place, pour éviter des effets polaires. La délétion du gène a été obtenue par transformation de *B. abortus* 544 par un insert de délétion. Une fois cette séquence insérée, des événements de recombinaison homologue pourront mener à la délétion partielle du gène d'intérêt.

Pour voir si le système MutM MutY MutT était impliqué dans la résistance au stress oxydatif, nous avons utilisé trois méthodes. Premièrement, les *disk assays*, qui permettent d'évaluer la différence de sensibilité de différentes souches face à un agent stressant choisi, ici le paraquat et le peroxyde d'hydrogène. Deuxièmement, les courbes de croissances, qui permettent de déterminer la capacité de différentes souches à croître dans un environnement stressant. Et troisièmement, le test des souches en infection cellulaire.

2.1. Disk assay

Le principe de cette méthode est simple : un grand nombre de bactéries (environ $4,5 \cdot 10^7$) sont uniformément étalées sur 2YT-agar, et un disque de papier Whatman imbibé d'un agent stressant est déposé en son centre. La diffusion du composé oxydant va créer un gradient de concentration, et il est donc possible d'évaluer les différences de sensibilité au stress testé entre différentes souches par mesure de la zone d'inhibition de croissance. Dans le cadre de nos

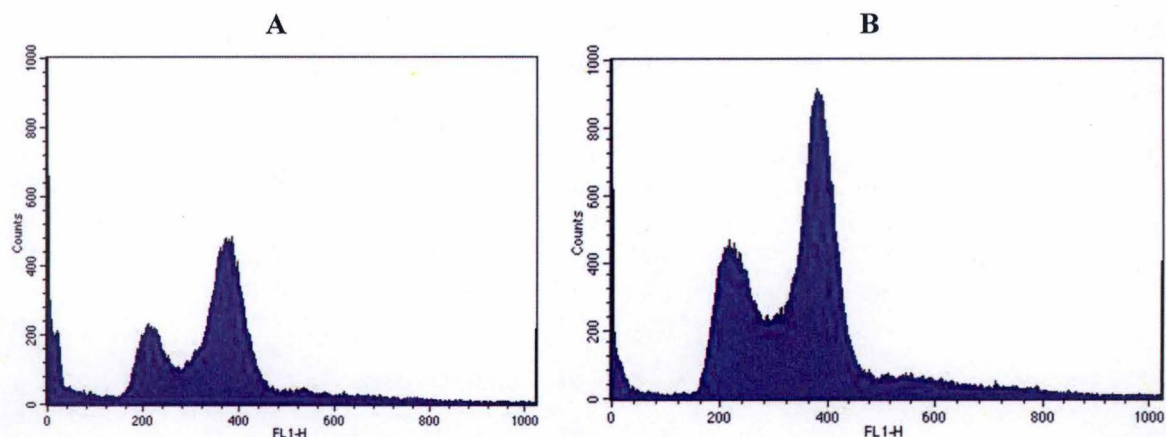


Figure 13: Quantité d'ADN dans les bactéries. (A) Contrôle. (B) Population soumise à 150 mM d'H₂O₂ pendant trois heures. « Counts » représente le nombre d'événements (gouttelettes avec une bactérie chacune) qui donnent une intensité de fluorescence (FL1-H) qui est proportionnelle à la quantité d'ADN dans chaque cellule bactérienne. Les deux pics majeurs représentent les bactéries avec une copie de leurs chromosomes (FL1-H ~200), ou deux copies de leurs chromosomes (FL1-H ~400).

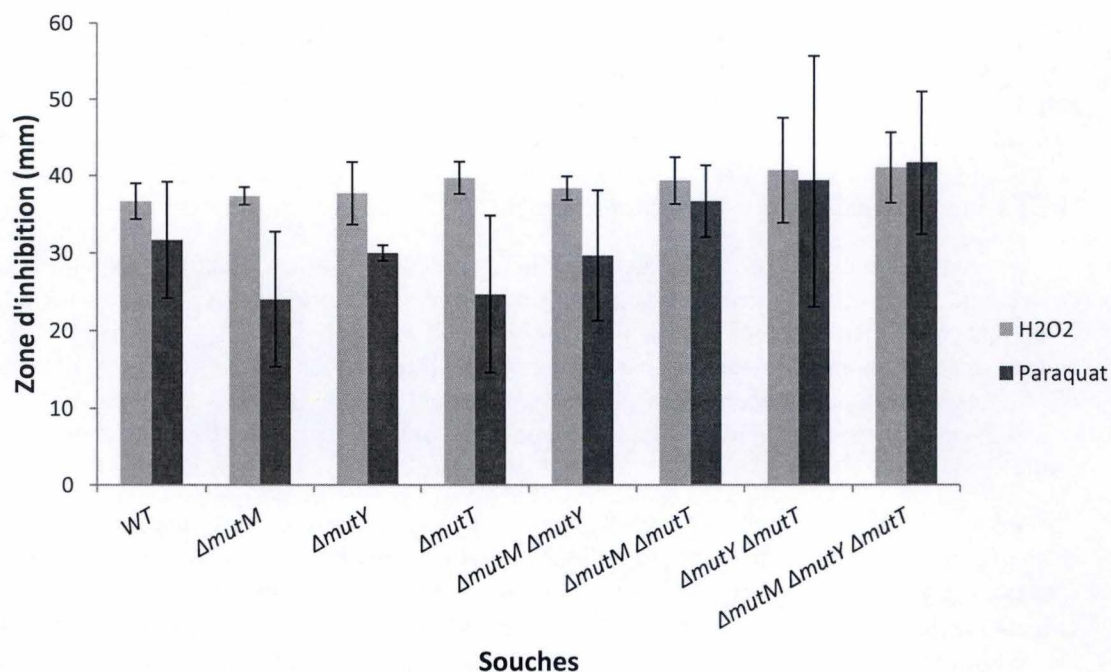


Figure 14: Sensibilité des différentes souches au stress oxydatif. Après étalement sur milieu 2YT-agar, un disque de papier Whatman (5 mm) imbibé de peroxyde d'hydrogène 30% ou de paraquat 300 mM est placé au centre de la boîte et le tout est incubé 3 jours à 37°C. La sensibilité de la souche est évaluée par la mesure de la zone d'inhibition de croissance autour du disque. Cette expérience a été réalisée trois fois.

expériences, des populations en phase exponentielle ont été utilisées. En effet, il est connu que lors de la phase stationnaire, les bactéries mettent en place différents mécanismes leur conférant une certaine résistance au stress oxydatif. Nous nous attendons donc à ce que les différences entre les souches soient plus visibles si la population est en phase exponentielle lors du stress.

Les expériences ont été réalisées en triplicats biologiques et techniques, en utilisant soit le paraquat, soit le peroxyde d'hydrogène comme agent stressant. Lors des mises au point, plusieurs concentrations en paraquat ont dû être testées pour trouver une dose à laquelle une zone d'inhibition de la croissance a pu être observée. Nous avons donc choisi d'utiliser une concentration en paraquat de 300 mM. En ce qui concerne le peroxyde d'hydrogène, nous avons utilisé une solution H₂O₂ 30% de chez Sigma-Aldrich, ce qui correspond à une concentration de 9,8 M.

Ici, 7 souches ont été testées. D'abord les trois simples mutants $\Delta mutM$, $\Delta mutY$ et $\Delta mutT$; ensuite les trois combinaisons possibles de doubles mutants $\Delta mutM\Delta mutY$, $\Delta mutM\Delta mutT$ et $\Delta mutY\Delta mutT$. Et enfin, la souche délétée pour tout le système $\Delta mutM\Delta mutY\Delta mutT$. Malheureusement, les résultats obtenus en utilisant le paraquat sont très variables d'une expérimentation à l'autre, et ne permettent pas de tirer de conclusion (Figure 14.B). Bien que la variabilité entre les expérimentations soit moins forte avec le peroxyde d'hydrogène, aucune différence significative de sensibilité au stress oxydatif n'a pu être mise en évidence entre les différentes souches (Figure 14.B).

2.2. Courbes de croissance

Pour définir les courbes de croissance des différentes souches, les bactéries ont été mises en culture dans du 2YT avec l'agent stressant, excepté pour le contrôle. Ici, seul le paraquat a été utilisé pour des raisons de biosécurité. En effet, *Brucella* possédant des catalases, l'ajout de peroxyde d'hydrogène se traduit par une libération rapide d'oxygène. Les puits de la plaque dans lesquels *Brucella* était mise en culture étant petits, il aurait été possible que les bulles d'oxygène forment une mousse et finissent par faire déborder les puits, et libérer *Brucella* dans le laboratoire. De plus, le peroxyde d'hydrogène étant rapidement neutralisé par la bactérie, il nous semblait plus judicieux d'utiliser le paraquat, sa durée d'action devant en théorie être plus longue.

Lors des mises au point, nous avons utilisé une concentration de 5 mM en paraquat, ce qui est faible comparé à ce qui a été utilisé pour l'évaluation de la proportion en G1. Or, déjà à cette concentration, *Brucella* ne pousse pas suffisamment que pour pouvoir mettre en évidence des différences de sensibilité au paraquat entre les souches. En effet, si les bactéries semblent se diviser pendant les premières heures, la croissance est lente : elles atteignent leur plateau à une DO de 0,2 après 8 heures, comparé à une DO de 0,8 pour le contrôle au même moment. De plus, dans la condition sans paraquat, les bactéries continuent à pousser jusqu'à la phase stationnaire environ 36 heures après le début de l'expérience et atteignent une DO d'environ 1,8 pour la souche sauvage (Figure 15.A).

Le stress apparaissant comme trop fort, nous avons décidé de réitérer l'expérience en baissant les concentrations à 0,5 mM. Malgré cette faible concentration, on remarque quand même une très nette inhibition de la croissance bactérienne. A part pour la souche $\Delta mutY\Delta mutT$, nous n'avons pu mettre en évidence aucune différence claire entre les différentes souches en ce qui concerne leur croissance, que ce soit en conditions normales ou stressantes (Figure 15.B).

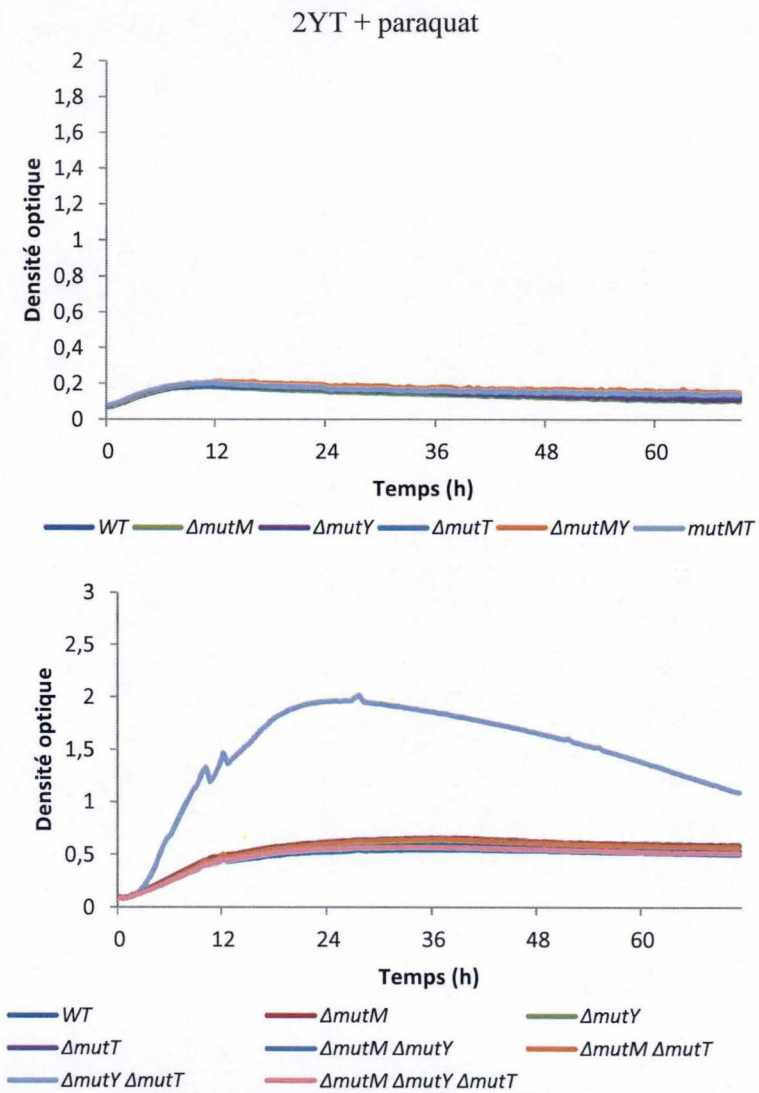
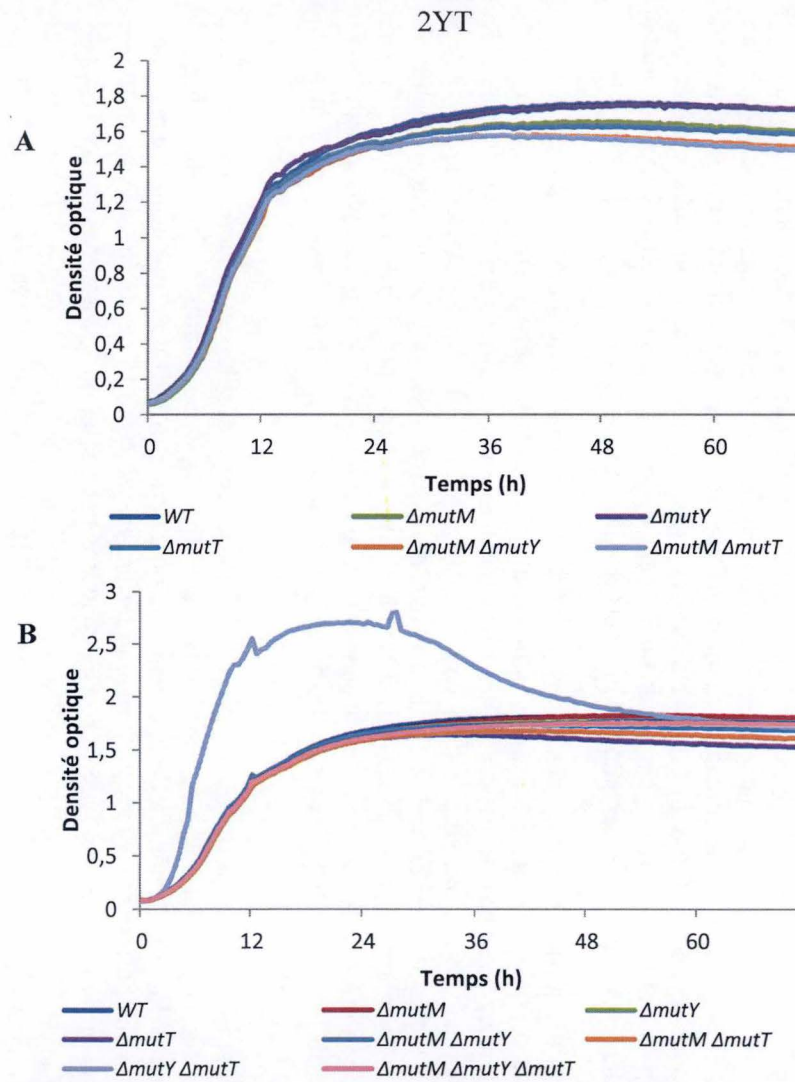


Figure 15: Courbes de croissance des différentes souches en milieu stressants. (A) 5mM paraquat, (B) 0,5mM paraquat.

2.3. Infection cellulaire

La méthode des *disk assay* et des courbes de croissance n'ayant pas permis de mettre en évidence une différence de sensibilité au stress oxydatif entre les souches *in vitro*, nous avons décidé d'utiliser un modèle plus complexe : l'infection en cellules. Nous avons donc infecté des macrophages RAW 264.7 avec nos différentes souches et extraits les bactéries après différents temps d'infection (2, 5 et 24 heures). Nous avons finalement réalisé des CFUs, pour déterminer la capacité d'une souche à infecter et se répliquer dans la cellule.

Lors des premières expériences, à 5 heures post-infection, une différence très hautement significative entre la souche sauvage et le double mutant $\Delta mutM \Delta mutY$ et une différence significative entre la souche sauvage et la souche triple délétante ont pu être mises en évidence. Vingt-quatre heures après le début de l'infection, des différences hautement significatives entre la souche WT et les souches $\Delta mutM$ et $\Delta mutY$, ainsi que des différences significatives entre la WT et les doubles mutants $\Delta mutM \Delta mutY$ et $\Delta mutM \Delta mutT$ ont été observées (Figure 16). Cependant, les expériences suivantes ont montré des résultats très différents et même contraires à ceux observés ici, indiquant que ces résultats ne sont pas reproductibles (données non montrées), même s'ils étaient statistiquement significatifs.

3. Caractérisation de la résistance au stress oxydatif de *B. abortus*

N'ayant pas pu montrer de différences de sensibilité entre nos différentes souches, nous nous sommes posé des questions en ce qui concerne la capacité de *Brucella* à résister au stress oxydatif. En effet, il serait possible que *Brucella* soit particulièrement bien équipée pour faire face à ce stress, et il en résulterait que les dérivés réactifs de l'oxygène n'auraient pas l'occasion d'interagir avec l'ADN, expliquant l'absence de phénotype observable. Nous avons donc utilisé la méthode des *disk assay* pour comparer la capacité de *Brucella* et de *E. coli* à se multiplier en présence de peroxyde d'hydrogène. Les variances étant trop différentes que pour pouvoir effectuer des tests statistiques, nous n'avons pas pu mettre en évidence de différences significatives entre les souches (Figure 17).

4. Mises au point du marquage à l'OxyBURST®

Les *disk assay* n'ayant pas permis de montrer une plus grande résistance au stress oxydatif de *B. abortus* par rapport à *E. coli*, nous nous sommes dit que *Brucella* évitait ce stress plutôt que de l'affronter dans les cellules. Cette hypothèse expliquerait pourquoi il n'y a pas de différence entre les différentes souches en infection. Pour tester cette hypothèse, nous avons donc décidé de marquer des bactéries avec une sonde sensible au peroxyde d'hydrogène, et d'infecter les cellules avec le pathogène afin de pouvoir détecter le stress oxydatif dans les cellules hôtes, avec comme contrôle, en parallèle, une infection en macrophages activés à l'interféron gamma et au LPS de *E. coli*. Lors de ce mémoire, nous avons réalisé les étapes initiales de ce projet de recherche.

L'OxyBURST-SE® (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate-succinimidyl ester, Thermo Fisher Scientific) est une forme réduite, acétylée et couplé à un groupement succinimidyl-ester de la sonde hautement fluorescente 2',7'-dichlorofluorescein. Le retrait des deux groupements acétyl par l'hydroxylamine, ainsi que l'oxydation de la sonde par l' H_2O_2 induit donc l'apparition de la fluorescence. Il en résulte donc qu'il est possible de quantifier la quantité de peroxyde

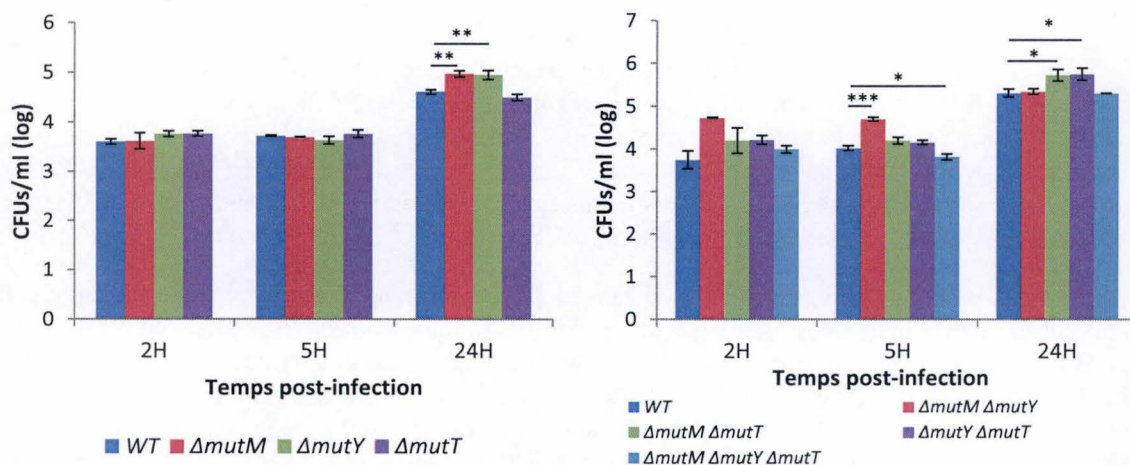


Figure 16: Comparaison des différentes souches en infection par réalisation de CFUs. Les macrophages RAW 264.7 ont été infectés par les différentes souches à une MOI de 50. Les bactéries ont été extraites des cellules au triton X100 aux différents temps mentionnés, et le nombre de CFUs / ml a été déterminé.

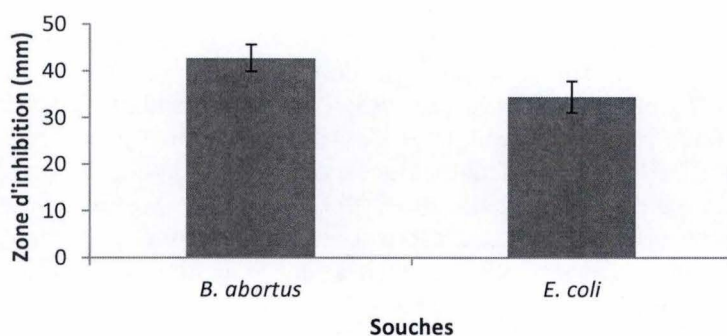


Figure 17: Comparaison des sensibilités au stress oxydatif entre *E. coli* et *B. abortus*. La sensibilité a été évaluée par *disk assay*, en utilisant du peroxyde d'hydrogène 30% comme agent stressant.

Sonde	Hydroxylamine	1 ^{er} ajout H ₂ O ₂ 30%	2 ^{eme} ajout H ₂ O ₂ 30%
V	+100 µl / ml	+20,4 µl / ml (200 mM)	+20,4 µl / ml (200 mM)
/	+100 µl / ml		
V	/	+20,4 µl / ml (200 mM)	+20,4 µl / ml (200 mM)

Tableau 1: Récapitulatif des contrôles effectués pour la mise au point des conditions de marquage optimal. L'autofluorescence des bactéries a été évaluée en effectuant la manipulation sans la sonde, et la tendance de la sonde à s'activer en conditions de culture normale, sans stress oxydatif en effectuant le marquage sans soumettre les bactéries au peroxyde d'hydrogène. L'H₂O₂ se trouvait en concentration finale à 200 mM après chaque premier ajout, et théoriquement à 400 mM après le second ajout, si l'on ne tient pas compte de l'action de la peroxydase et de la catalase.

d'hydrogène auquel une bactérie marquée par cette sonde est soumise par mesure de l'intensité de la fluorescence. Le marquage de bactéries avec la sonde OxyBURST®-SE se passe donc en deux étapes. Premièrement, la réaction du groupement succinimidyl ester du marqueur avec les amines accessibles présentées par les protéines de la membrane externe et deuxièmement l'activation de la sonde par clivage des groupements acétyle par l'hydroxylamine.

La méthode délivrée par le fabricant étant optimisée pour le marquage de protéines et non de bactéries, nous avons dû adapter le mode opératoire. Nous avons donc commencé par marquer des bactéries en culture, avant de passer aux infections. Différents temps de marquage et d'activation à l'hydroxylamine ont été testés. Ensuite, nous avons testé l'activation de la fluorescence de la sonde. Nous avons utilisé du peroxyde d'hydrogène et du paraquat. Si ce dernier n'a montré aucune activation de la sonde, l' H_2O_2 a montré de meilleurs résultats. La production de dérivés réactifs de l'oxygène étant continue en cellule, et l'ajout exogène de peroxyde d'hydrogène étant rapidement neutralisée par les catalases et les peroxydases des bactéries, nous avons ajouté le peroxyde d'hydrogène en deux fois, à 15 minutes d'intervalle. Pour des résultats optimaux, 1 heure de marquage et 1 heure d'activation sont nécessaires. Cependant, même dans ce cas, seule une partie de la population (47,1%, N=257) montre très clairement une forte différence de fluorescence (Figure 18.A). Des analyses informatiques et statistiques sont donc nécessaires. A chaque expérience, deux contrôles ont été réalisés : sans étape de stress et sans marquage à l'OxyBURST (Tableau 1). Dans le premier cas, seule une très faible proportion de bactéries est marquée (3,7%, N=461). Dans le second cas, un très faible signal de background est visible.

Le dernier paramètre que nous ayons testé est une fixation au paraformaldéhyde (PFA), pour contrôler si la fixation n'influe pas la fluorescence de la sonde, et un double marquage OxyBURST® / Texas RED-succinimidyl ester. Les résultats obtenus montrent qu'il est possible de fixer les échantillons sans perdre la fluorescence (Figure 18.B) et de réaliser les deux marquages en même temps (Figure 18.C). Ceci nous servira à l'avenir pour trouver les bactéries dans la cellule hôte, en microscopie à fluorescence.

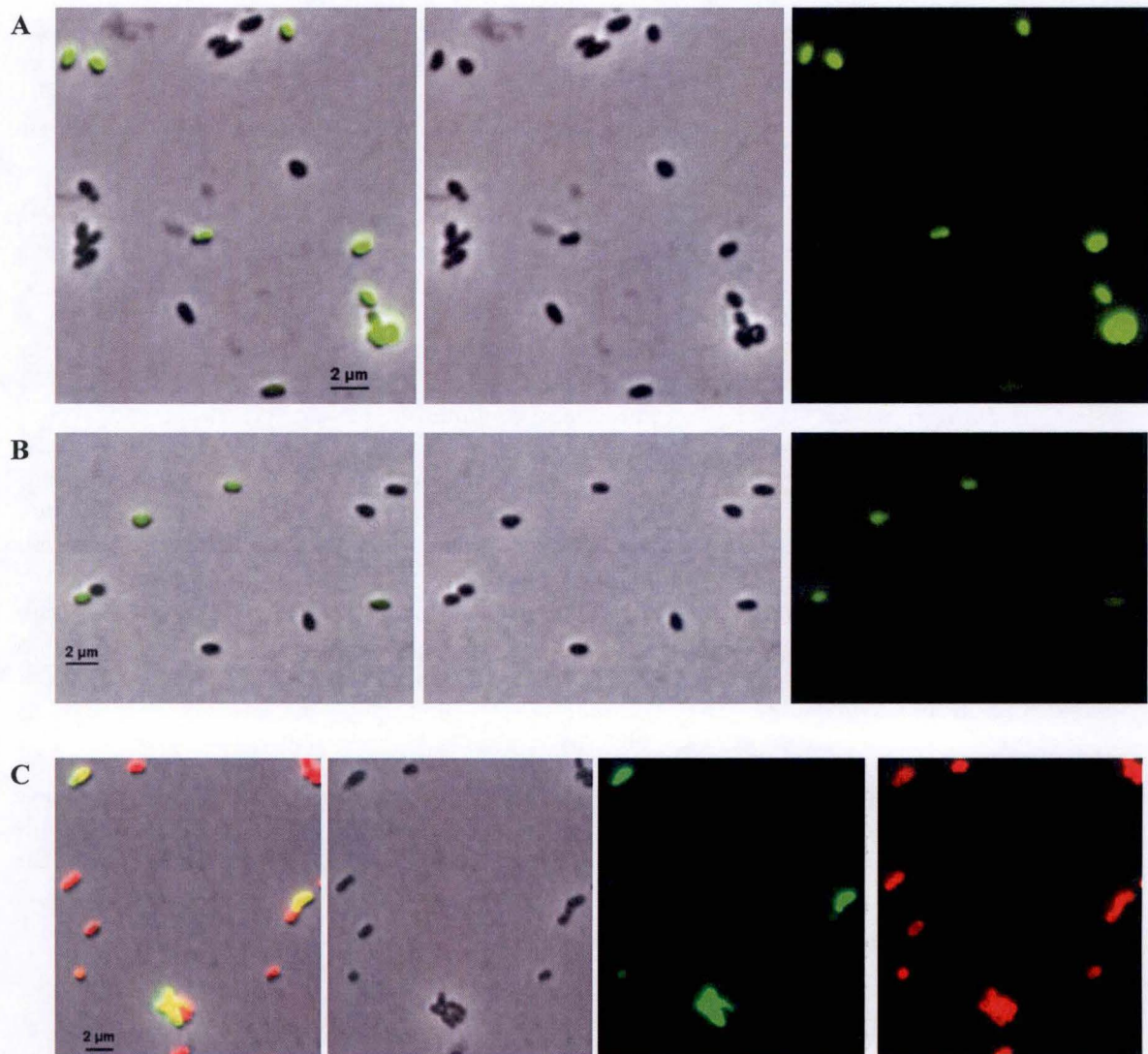


Figure 18: Image des mises au point du marquage à l'OxyBURST-succinimidyl-ester. (A) marquage obtenu dans les conditions optimales définies dans le texte. **(B)** Fluorescence après fixation au paraformaldéhyde. **(C)** Double marquage OxyBURST-succinimidyl-ester / TexasRED-succinimidyl-ester. Seule une partie des bactéries est positive pour la fluorescence rapportrice de l'OxyBURST après le stress oxydant, et le double marque OxyBURST-SE et TRSE est possible.

Discussion et perspectives

Discussion et perspectives

1. Le stress oxydatif ne semble pas provoquer d'accumulation en G1

Il a précédemment été démontré que, pour les cellules HeLa et les macrophages RAW 264.7, les *Brucella* en G1 sont plus infectieuses que les autres, et que la bactérie arrête son cycle cellulaire et sa croissance durant les premières heures suivant l'entrée en cellule (Deghelt et al., 2014). Cependant, la nature de l'avantage sélectif de ce blocage reste inconnue. L'hypothèse avancée ici est que la bactérie stopperait son cycle pour faire face aux différents stress rencontrés dans la eBCV. Des résultats obtenus par Katy Poncin avec le stress alkylant semblent d'ailleurs abonder en ce sens : l'ajout de MMS dans une culture de *B. abortus* induit une augmentation de la proportion de G1 (données non publiées). Cependant, nous ne savons pas si ce type de stress est effectivement rencontré par les bactéries dans les eBCVs. Nous avons décidé de tester un autre type de stress potentiellement rencontré dans la vacuole : le stress oxydatif induit par les dérivés réactifs de l'oxygène. Cependant, nous n'avons pas pu observer d'accumulation en G1 à la suite d'un stress oxydatif, qu'il soit induit par le paraquat ou par le peroxyde d'hydrogène. Il semble donc que le fait d'être en G1 ne soit pas une stratégie mise en place pour faire face à un stress oxydatif.

Il est possible de critiquer le fait que nous ne soyons pas montés suffisamment haut dans les concentrations en paraquat. En effet, aucune chute de CFUs n'est visible dans ces conditions. Cependant, il semblerait que le paraquat ait un effet bactériostatique plutôt que bactéricide. En effet, la consommation d'O₂ nécessaire pour atteindre une concentration mortelle en dérivés réactifs de l'oxygène serait trop grande que pour être plausible (Imlay, 2015). Cette hypothèse est d'ailleurs supportée par nos résultats. En effet, une concentration de 5 mM en paraquat est suffisante pour inhiber la croissance de *Brucella*. Cependant, après 3 heures d'incubation avec des concentrations 50 fois plus fortes (250 mM) suivies d'un lavage au PBS, aucune chute de CFUs comparé au temps 0 n'est observable. Ces résultats semblent donc en effet plutôt montrer un effet bactériostatique que bactéricide. De plus, nous sommes montés beaucoup plus haut dans les concentrations en paraquat que ce qui a été trouvé dans la littérature pour *E. coli* (Bianchi et al., 1995; Mosel et al., 2013)

Cependant, il faut noter que le stress oxydatif n'est sans doute pas le seul stress rencontré par la bactérie. Il en existe de nombreux autres, comme la famine, le pH acide, la carence en fer ou encore les dérivés réactifs de l'azote (Roop et al., 2013). Il serait donc possible que différents facteurs agissent en synergie, et que la sélection du stade G1 soit donc une réponse non pas à un, mais à plusieurs stress simultanés. Il est d'ailleurs bien connu que l'interaction d'anions superoxyde (produits par la NADPH oxydase) avec l'oxyde nitrique (produit par l'oxyde nitrique synthase) mène à la formation de peroxynitrite, un composé extrêmement réactionnel, et donc toxique pour la bactérie (Prolo et al., 2015).

Pour terminer cette partie, nous avons réalisé de la cytométrie de flux sur les bactéries soumises à du peroxyde d'hydrogène. Pour rappel, ces bactéries présentaient un nombre anormal de spots lorsque nous utilisions la souche *NoriI*. Nous avons donc voulu voir si la quantité d'ADN synthétisée augmentait aussi, ce qui aurait pu indiquer une répllication incontrôlée du

chromosome. Or, les résultats obtenus ne montrent pas de différences entre la condition normale et stressante. Ces données pourraient montrer que la bactérie est bien capable d'initier la réplication de son chromosome, mais que celle-ci avorte rapidement. Il s'en suivrait un nouvel essai, et le résultat final serait un nombre anormal d'origines de réplication, mais pas une réelle augmentation de la quantité d'ADN. Une deuxième explication possible serait que les protéines ParB-YFP, sous l'effet du peroxyde d'hydrogène, s'agrègent en amas visibles en microscopie, ce qui donnerait lieu à ces spots, mais qui ne reflèteraient cependant pas le nombre d'origines de réplications présentes dans la cellule.

2. Le système MutM MutY MutT ne semble pas essentiel face au stress oxydatif

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons voulu caractériser le comportement de souches délétées pour un système de réparation de dommages oxydatifs de l'ADN, lorsqu'elles sont confrontées à un stress oxydatif *in vitro*, et lors d'infections de macrophages où il est probable qu'un tel stress soit rencontré.

Certaines études ont déjà montré que la délétion de ce système chez *E. coli* se traduisait par une forte augmentation de la fréquence des mutations, au moins dans les souches délétées pour deux membres ou plus du système MutM MutY MutT (Fowler et al., 2003). Bien qu'aucune étude n'ait jamais tenté de mettre en évidence des différences de viabilité entre les souches délétantes, il pourrait sembler logique que lors d'un stress oxydatif, le nombre de mutations non réparées devienne trop important, et mène finalement à la mort des bactéries. Cependant, ce n'est pas ce que nous observons ici. En effet, aucune des techniques utilisées n'a pu mettre en évidence de différence de sensibilité au stress oxydatif entre les souches.

In vitro, la technique des *disk assay* montre un problème de variabilité importante entre les expériences. Ceci pourrait être dû à plusieurs facteurs. Il est par exemple difficile d'étaler les bactéries de manière parfaitement homogène sur milieu solide. Or, nous savons qu'une densité plus forte en bactéries confère à ces dernières une plus grande résistance au stress oxydatif. Ceci est expliqué par la plus grande concentration en enzymes protectrices comme les superoxydes dismutases ou les catalases. Il en découle aussi que d'une fois à l'autre, si la densité bactérienne n'est pas exactement la même, des résultats différents seront probablement obtenus. A cause de cet effet de protection mutuel des bactéries, nous avons réalisé des *disk assay* en diminuant la densité de population étalée sur boîte de Petri. Cependant, même dans ces conditions aucune différence entre les souches n'a pu être observée. Il serait dès lors intéressant de réitérer l'expérience avec des densités bactériennes encore plus faibles.

Si la technique des *disk assay* ne semble pas idéale pour mettre en évidence de faibles différences au niveau de la sensibilité au stress oxydatif, la méthode des courbes de croissance pourrait donner des résultats plus aisés à quantifier et plus reproductibles. Elle n'a néanmoins montré aucune différence notable entre les souches, excepté pour la souche $\Delta mutY \Delta mutT$ lors des courbes de croissances. Cependant, il faut noter que la meilleure croissance de ces bactéries comparées aux autres est plus probablement due à une contamination du milieu qu'à une réelle différence de sensibilité au stress oxydatif. En effet, une telle différence devrait se voir lors des *disk assay*, ce qui n'est pas le cas.

Lors de l'infection de macrophages, si l'on prend les résultats séparément, il est possible de mettre en évidence des différences significatives entre certaines souches. Cependant, la non reproductibilité des résultats entre expérimentations montre que ces différences seraient plutôt dues à une variabilité propre à l'expérience qu'aux souches elles-mêmes. Il est donc possible de conclure que les différentes souches ne sont pas affectées en termes d'infectiosité, de capacité de survie dans la eBCV ou de réplication dans la rBCV.

Ces résultats pourraient être expliqués de diverses façons. Il faut tout d'abord noter que chez *E. coli*, les simples mutants montrent des taux de mutation similaire à la souche sauvage (Fowler et al., 2003). Il apparaît donc logique que ces mutants n'aient pas de phénotype visible au niveau de la survie en cas de stress oxydatif.

Ensuite, comme nous l'avons déjà mentionné, MutY est une enzyme à double tranchant. En effet, si elle peut prévenir l'apparition de mutations, elle peut aussi augmenter le nombre de transversions A·T→C·G. En fait, il a même été montré que MutY est régulé négativement lors d'un stress oxydatif chez *E. coli*. Cette protéine serait dès lors exprimée et active en conditions normales. Néanmoins, le taux de mutation qu'elle engendrerait lors d'un stress oxydatif serait trop important et il serait donc avantageux d'arrêter la transcription du gène (Yoon et al., 2003). L'absence de phénotype observable pour les souches délétées pour *mutY* peut donc être expliquée par le fait que le gène *mutY* serait réprimé lors d'un stress oxydatif, et donc sa délétion ne résulterait pas en un phénotype visible dans de telles conditions. Une manipulation qui serait intéressante de réaliser à l'avenir serait d'évaluer et de comparer le taux de mutation entre les différentes souches. Une manière serait d'observer l'apparition de résistances à la rifampicine. En effet, des mutations dans le gène *rpoB*, codant pour une sous-unité de l'ARN polymérase, mène à ce genre de résistance (Fowler et al., 2003; Jin and Gross, 1988). Etant donné que la brucellose humaine est traitée avec de la rifampicine, il serait judicieux d'utiliser la résistance au 5-fluoro-orotate (5FOA), qui est médiée par l'inactivation des gènes *pyrE* ou *pyrF*, les homologues de *URA5* et *URA3* chez les levures.

Ensuite, il faut être conscient que *Brucella*, et les bactéries en général, possèdent de multiples systèmes de réparation de l'ADN (Baharoglu and Mazel, 2014), dont certains peuvent réparer tous types de lésions et ne se limitent pas à un dommage en particulier. Il serait donc possible que la délétion d'un ou plusieurs membres du système MutM MutY MutT soit au moins en partie complétée par un autre système de réparation de l'ADN.

En outre, une augmentation de la fréquence de mutations ne se traduit pas forcément par la mort cellulaire. Une étude a même montré que, chez *Pseudomonas aeruginosa*, si la délétion du système MutM MutY MutT résulte bel et bien en une augmentation de la fréquence des mutations, cette dernière pourrait avoir des effets bénéfiques sur la bactérie. En effet, ils ont mis en évidence une augmentation de la fréquence d'apparition de résistance aux antibiotiques. De manière surprenante, ils suggèrent même l'utilisation d'antioxydants pour diminuer la formation de dérivés réactifs de l'oxygène, ce qui mènerait à une baisse du taux de mutation pour prévenir l'apparition de résistance aux antibiotiques (Mandsberg et al., 2009).

En fait, l'idée que les dérivés réactifs de l'oxygène et les mutations qui en découlent ont un effet bactéricide provient des études réalisées sur les radiations ionisantes. Ces dernières mènent à la formation de radicaux libres hydroxyles, susceptibles de réagir avec l'ADN. Cependant, il existe une différence capitale entre les radiations ionisantes et l'apport exogène de dérivés

réactifs de l'oxygène. En effet, les premières mènent à une formation très localisée de radicaux libres, ce qui se traduit par des lésions qui peuvent être très proches sur l'ADN, et peut finalement mener à des ruptures doubles brins potentiellement létales (Imlay, 2015). Une étude a même montré que ces cassures doubles brins pouvaient être le résultat de l'activité de systèmes de réparation des ADN glycosylases, dont MutM et MutY font partie. En effet, les radiations ionisantes menant à la formation de clusters de lésions, la réparation simultanée de deux bases endommagées en vis-à-vis par des ADN glycosylases mène à des ruptures double brin (Chang et al., 2005). A l'opposé, un apport exogène de ROS induit une formation de dommages de manière beaucoup plus dispersée sur l'ADN, ce qui permet une réparation beaucoup plus efficace (Imlay, 2015). Un stress oxydatif de cette nature serait donc plutôt bactériostatique et non bactéricide comme il est communément pensé (Imlay, 2015). Ces données semblent montrer que le rôle du *burst* oxydatif aurait été surestimé par le passé et qu'il faudrait plutôt considérer la capacité des macrophages à supprimer les pathogènes comme étant le résultat de divers facteurs.

Quand on parle d'effet bactériostatique du stress oxydatif, il peut être tentant de faire le lien avec l'arrêt du cycle cellulaire observé durant les premières heures suivant l'infection. Cependant, cette hypothèse nous paraît peu probable. En effet, les données fournies par la cytométrie de flux pourraient indiquer que la cellule initie bien la réplication de son ADN lorsqu'elle est soumise au peroxyde d'hydrogène, mais serait incapable de la terminer. Elle recommencerait plusieurs cycle d'initiation / avortement de la réplication du chromosome. Il apparaît donc comme peu probable que ce stress oxydatif soit à l'origine du blocage du cycle cellulaire en G1.

Finalement, il est aussi possible que *B. abortus* soit particulièrement bien équipée pour faire face au stress oxydatif. En effet, nous avons déjà vu qu'elle possédait plusieurs enzymes pour faire face aux dérivés réactifs de l'oxygène. Elle possède aussi deux superoxydes dismutases, l'une cytoplasmique et l'autre périplasmique, et il a été montré que cette dernière est importante pour la protection contre le *burst* oxydatif en macrophage (Gee et al., 2005). Il est donc dès lors possible qu'aucun phénotype ne soit observable pour ces souches simplement car les ROS n'ont pas l'occasion d'interagir et de causer des dommages à l'ADN. Nous avons donc décidé de comparer la résistance au stress oxydatif de la souche sauvage de *B. abortus* avec *E. coli*, pour déterminer si *B. abortus* est effectivement particulièrement résistante au stress oxydatif.

3. *B. abortus* éviterait le stress oxydatif plutôt que de le combattre

Bien qu'à chaque expérience de *disk assay* les zones d'inhibition de croissance observées pour *B. abortus* soient plus grandes que pour *E. coli*, l'analyse statistique n'a pas montré de différence significative de sensibilité au peroxyde d'hydrogène entre les deux bactéries. Ces résultats indiquent que, contrairement à l'hypothèse qui avait été émise, *Brucella* ne semble pas particulièrement résistante au stress oxydatif. Ces résultats sont appuyés par le fait que *E. coli* encode en son génome une superoxyde dismutase de plus (Fe-SOD) et une catalase (KatG) de plus que *Brucella* (Imlay, 2013).

On sait que *Brucella* doit faire face à un environnement pauvre en nutriments durant les premières heures de l'infection, et par exemple, elle est soumise à une carence en manganèse (Anderson et al., 2009). Or, la seule superoxyde dismutase décrite chez *B. abortus* à ce jour est une Mn-SOD, qui a donc besoin de manganèse pour être fonctionnelle. Il serait donc possible que

la bactérie soit particulièrement sensible au stress oxydatif dans la eBCV. Or, les CFUs semblent être stables à ce niveau (Comerci et al., 2001). Il serait donc dès lors possible que *Brucella* soit capable d'éviter le stress oxydatif plutôt que de le combattre. Cependant, un argument contraire peut contrebalancer cette hypothèse : les transporteurs à Mn^{++} ont été décrits comme étant cruciaux lors de l'infection, bien que le rôle de ces ions ne soit pas encore totalement compris (Anderson et al., 2009; Roop et al., 2013). Il se pourrait donc que le transport de manganèse soit capital justement pour garder une quantité suffisante de superoxyde dismutase active, ainsi que d'autres enzymes, telle que l'homologue de RelA-SpoT (Rsh), qui médie la réponse de famine (Dozot et al., 2006). Dans le même ordre d'idée, il serait possible que la bactérie stoppe sa croissance pour faire face à la famine en manganèse et ainsi éviter une « dilution » des Mn-SOD au cours des différents tours du cycle cellulaire. Encore une fois, il serait donc possible que l'avantage d'être en G1 ne soit visible que lorsque différents stress sont combinés, et il serait donc dès lors intéressant d'investiguer en cette direction. Cependant, cette théorie n'explique pas pourquoi le stade G1 a été choisi durant l'évolution pour infecter les cellules. Alternativement, la sélection des G1 à l'entrée en cellules HeLa ou en RAW 264.7 pourrait n'être qu'un artéfact dû à l'expression préférentielle d'une forme d'adhésion ou d'internalisation dans les bactéries récemment issues de la division cellulaire, et il n'y aurait dès lors aucun avantage sélectif à internaliser les bactéries au stade G1 dans les cellules hôtes.

Ces conclusions, combinées avec les résultats des infections semblent indiquer que durant l'évolution, *B. abortus* a sans doute développé une stratégie d'évasion au stress oxydatif durant l'infection plutôt qu'une forte résistance. En effet, si le stress oxydatif était une étape limitante durant l'infection des macrophages, on pourrait s'attendre à des dommages oxydatifs causés à l'ADN, et donc à une moins bonne survie des souches délétées pour le système MutM MutY MutT, ce qui n'est pas le cas ici. Cependant, il faut noter que nous n'avons pas testé ces souches en macrophages activés avec de l'interféron gamma et du LPS d'*E. coli* par exemple. Il serait dès lors peut être intéressant d'investiguer dans cette direction à l'avenir.

Si certaines études ont déjà montré que si *Brucella* induisait un *burst* oxydatif dans les neutrophiles, celui-ci est faible (Barquero-Calvo et al., 2007). De plus, une autre équipe a montré que *Brucella* survit aussi bien dans des macrophages délétés pour la NADPH oxydase que dans des macrophages sauvages (Sun et al., 2002). Cependant, une différence de survie a pu être mise en évidence dans des macrophages activés à l'interféron gamma (Sun et al., 2002). Or, cette différence n'est plus observable *in vivo*, dans des souris ne possédant pas un complexe NADPH oxydase fonctionnel (Barquero-Calvo et al., 2007; Sun et al., 2002). Les macrophages *in vivo* se défendraient donc moins bien que les macrophages activés *in vitro*. Il apparaîtrait aussi que la eBCV soit bien moins riche en NADPH oxydase que la rBCV, expliquant la survie de *Brucella* pendant les premières heures de l'infection des macrophages (Gay et al., 1984). De plus, il semblerait que les concentrations en peroxyde d'hydrogène dans le phagosome des macrophages ne soient pas suffisantes pour être bactéricides (Imlay, 2015). Si le fait que les macrophages ne soient pas capables de produire suffisamment de ROS que pour éliminer les bactéries peut paraître surprenant, ceci pourrait encore une fois indiquer que le stress oxydatif n'agit pas seul pour exercer son action bactéricide.

Si tous ces résultats semblent indiquer que *Brucella* est effectivement capable d'éviter le stress oxydatif durant l'infection, il n'a encore jamais été clairement montré qu'elle ne ressentait pas un tel stress.

Nous avons donc voulu investiguer dans cette direction et voir, si oui ou non, *B. abortus* est confrontée à un stress oxydatif durant l'infection de macrophages RAW 264.7. Pour ce faire, nous avons utilisé une sonde sensible au peroxyde d'hydrogène, capable de se lier à la membrane externe des bactéries : l'OxyBURST®-succinimydyl ester. Comme mentionné précédemment, il n'a pas été possible d'observer une population positive de manière homogène : si certaines sont clairement fluorescentes, la plupart montrent seulement un niveau d'activation faible ou moyen. Cependant, les bactéries stressées avec l'H₂O₂ étaient globalement plus fluorescentes que les bactéries non stressées (47,1% de la population clairement marquée en condition de stress contre 3,7% en condition non stressante). C'est pourquoi nous avons décidé de tester ces souches en infection. Ici, nous avons testé en parallèle l'infection en macrophages naïfs et en macrophages activés au LPS d'*E. coli* et à l'interféron gamma. Au moment où sont écrites ces lignes, les résultats ne sont pas encore disponibles. Nous prévoyons de réaliser des analyses informatiques et statistiques comparant une population en culture, marquée et soumise à un stress à nos échantillons provenant de l'infection pour déterminer si *Brucella* est confrontée à un stress oxydatif en cellule. Une autre manipulation intéressante serait de comparer le taux de mutation entre les différentes souches délétées pour le système MutM MutY MutT en infection, comme expliqué dans la section « Le système MutM MutY MutT ne semble pas essentiel face au stress oxydatif ». Si *in vitro* les souches présentent des taux de mutations en condition de culture ou lors d'un stress oxydatif comme c'est le cas chez *E. coli* (Fowler et al., 2003), ceci pourrait aussi nous permettre de voir si oui ou non *Brucella* rencontre un stress oxydatif en infection.

Conclusion

Conclusion

Nous avons basé ce travail sur un fil conducteur : les dommages à l'ADN. En effet, ceux-ci sont potentiellement causés par toute une série de stress potentiellement rencontrés dans l'endosome. De plus, *B. abortus* entre préférentiellement en cellule hôte en G1 et elle bloque son cycle cellulaire durant les premières heures suivant l'infection. Or, la principale différence entre le stage G1 et G2/S est l'absence de réplication de l'ADN et la présence de seulement une seule copie des chromosomes. Nous avons donc avancé l'hypothèse que la sélection, au cours de l'évolution, du stade G1 pour infecter les cellules hôtes avait été favorisée par une meilleure survie de ce type bactérien face aux stress à l'ADN rencontrés dans la eBCV par *B. abortus*. Ainsi, il est possible que la non réplication de son l'ADN soit une manière pour la bactérie de prendre le temps de réparer les lésions causées à son ADN.

Parmi les différents stress rencontrés, le stress oxydatif est sans doute le plus décrit de tous et il est bien connu que les dérivés réactifs de l'oxygène peuvent causer des dommages à l'ADN. Nous avons donc décidé de commencer nos investigations de ce côté.

Dans ce travail, nous n'avons pas pu montrer un avantage des G1 par rapport aux autres stades pour faire face au stress oxydatif. De plus les résultats obtenus par la caractérisation des délétants pour le système MutM MutY MutT n'ayant montré aucune différence de survie entre les deux souches, deux hypothèses s'ouvrent à nous : soit *Brucella* a développé au cours de l'évolution des capacités exceptionnelles pour faire face au stress oxydatif, soit elle réussit à éviter ou ce stress durant l'infection.

La comparaison de la sensibilité au peroxyde d'hydrogène de *Brucella* et de *E. coli* ne nous a pas montré une capacité hors du commun du pathogène à résister au stress oxydatif. Nous pensons donc actuellement que la stratégie mise au point par *Brucella* est d'éviter les dérivés réactifs de l'oxygène plutôt que de les combattre. Pour vérifier cette hypothèse, nous sommes actuellement en train de réaliser des infections avec des bactéries marquées par une sonde sensible au peroxyde d'hydrogène. Cette dernière devrait pouvoir nous confirmer si oui ou non, *B. abortus* est soumise au burst oxydatif durant l'infection cellulaire.

Enfin, un dernier point d'importance soulevé dans ce mémoire est que si le rôle du stress oxydatif dans le contrôle de la brucellose semble avoir été surestimé, il se pourrait que ce soit aussi le cas pour le reste des bactéries pathogènes intracellulaires. En effet, des dérivés réactifs de l'oxygène semblent avoir un effet bactériostatique plutôt que bactéricide et ce, même dans les phagosomes (Imlay, 2015). Il serait donc intéressant de revoir le rôle du burst oxydatif dans l'élimination de pathogènes intracellulaires, et de ne pas sous-estimer la synergie possible entre les différents stress possiblement rencontrés dans les macrophages.

Matériel et méthodes

Nom	Genotype	Description	Référence
<i>B. abortus</i> 544	<i>B. abortus</i> 544 Nal ^R	Souche sauvage	J.-M. Verger, INRA, Tours
<i>NoriI</i>	<i>B. abortus</i> 544 <i>NoriI::parS_{pMT1}/</i> <i>pMR10 yfp-parB_{pMT1}</i>	<i>B. abortus</i> 544 avec une séquence <i>parS</i> (du plasmide pMT1) insérée près de l'origine de réplication du chromosome I (<i>oriI</i>). Cette séquence est reconnue par ParB – YFP, encodée sur un plasmide pMR10	J.-F. Sternon, URBM, Namur ¹
$\Delta mutM$	<i>B. abortus</i> 544 $\Delta mutM$	<i>B. abortus</i> 544 délétée pour <i>mutM</i>	Cette étude
$\Delta mutY$	<i>B. abortus</i> 544 $\Delta mutY$	<i>B. abortus</i> 544 délétée pour <i>mutY</i>	Cette étude
$\Delta mutT$	<i>B. abortus</i> 544 $\Delta mutT$	<i>B. abortus</i> 544 délétée pour <i>mutT</i>	Cette étude
$\Delta mutM\Delta mutY$	<i>B. abortus</i> 544 $\Delta mutM\Delta mutY$	<i>B. abortus</i> 544 délétée pour <i>mutM</i> et <i>mutY</i>	Cette étude
$\Delta mutM\Delta mutT$	<i>B. abortus</i> 544 $\Delta mutM\Delta mutT$	<i>B. abortus</i> 544 délétée pour <i>mutM</i> et <i>mutT</i>	Cette étude
$\Delta mutY\Delta mutT$	<i>B. abortus</i> 544 $\Delta mutY\Delta mutT$	<i>B. abortus</i> 544 délétée pour <i>mutY</i> et <i>mutT</i>	Cette étude
$\Delta mutM\Delta mutY\Delta mutT$	<i>B. abortus</i> 544 $\Delta mutM\Delta mutY\Delta mutT$	<i>B. abortus</i> 544 délétée pour <i>mutM</i> , <i>mutY</i> et <i>mutT</i>	Cette étude

Tableau 2: Liste des souches utilisées dans cette étude.

Matériel et méthodes

1. Souches et culture

1.1. *Brucella abortus*

Durant cette étude, *B. abortus* 544 a été utilisée comme souche sauvage (WT). Toutes les autres souches ont été obtenues à partir de celle-ci (**Tableau 2**). Elles ont été cultivées à 37°C dans du 2YT durant la nuit pour les cultures liquides, et pendant trois jours pour les cultures sur milieu solide. La composition des différents milieux est disponible dans le **Tableau 3**. Des antibiotiques pouvaient éventuellement être ajoutés selon le plasmide intégré : 10 µg/ml de kanamycine pour le plasmide pNPTS138, utilisé pour l'intégration des inserts de délétion lors des conjugaisons avec *E. coli*. *B. abortus* 544 étant résistante à l'acide nalidixique, cet antibiotique a aussi été utilisé lors des conjugaisons pour sélectionner *Brucella* par rapport à *E. coli*. Les souches sont stockées dans du 2YT + 30% glycérol à -80°C.

1.2. *Escherichia coli*

Pour l'obtention des souches de délétion de *B. abortus*, *E. coli* a été utilisé pour l'amplification de l'insert de délétion et pour son transfert vers *B. abortus* 544 (voir ci-dessous). *E. coli* a été cultivé durant la nuit dans du milieu Luria-Bertani (LB, composition **tableau 3**). De la kanamycine (50 µg/ml) pouvait éventuellement être ajouté au milieu pour sélectionner les bactéries ayant intégré le plasmide pNPTS138 (medium copy number). Les souches sont stockées dans du LB + 30% glycerol à -80°C.

1.3. Macrophages RAW 264.7

Les macrophages RAW 264.7 sont cultivés en milieu DMEM + 10% de sérum bovin décomplémenté par chauffage à 56°C (par simplicité, ce milieu sera appelé DMEM à partir d'ici).

2. PCR

2.1. Q5®

Pour l'obtention et l'amplification des inserts de délétion, la polymérase de haute-fidélité Q5® (New England Biolabs® Inc) a été utilisée. Le mix PCR est composé de 10 µl de Q5 5X buffer, 4µl de dNTPs (5mM chacun), 0.5 µl de chaque primer (20 µM chacun), 1µl d'ADN template, 0,5µl de l'enzyme (2000 unités/ml) et finalement de 33.5 µl d'eau pour obtenir un volume final de 50 µl. Le cycle des températures est divisé en trois grandes étapes : la dénaturation initiale (30 secondes, 98°C), l'amplification et l'élongation finale (10 minutes, 72°C). L'étape d'amplification est elle-même divisée en trois étapes répétées 30 fois : dénaturation (98°, 10 secondes), hybridation (10 secondes, température dépendant des primers utilisés) et élongation (30 secondes/1000 paires de bases à amplifier, 72°C). Une étape préliminaire a été ajoutée pour la PCR d'assemblage (PCR-3) : 5 cycles (dénaturation, hybridation et élongation) sans primer. Cette étape a pour but une hybridation correcte des produits des PCR -1 et -2. La liste des primers est disponible en annexe (**Tableau 4**)

LB liquide (LB broth base)	Peptone	10 g/l
	Extrait de levure	5 g/l
	Chlorure de sodium	5 g/l
LB solide	Peptone	10 g/l
	Extrait de levure	5 g/l
	Chlorure de sodium	5 g/l
	Agar	15 g/l
2YT liquide	Peptone	16 g/l
	Extrait de levure	10 g/l
	Chlorure de sodium	5 g/l
2YT solide	Peptone	16 g/l
	Extrait de levure	10 g/l
	Chlorure de sodium	5 g/l
	Agar	13 g/l

Tableau 3: composition des différents milieux de culture.

	Nom	Séquence
$\Delta mutM$	F _{upstream} mutM	gccccattgaaggtcgatc
	F ₁ mutM	CTGCAGTtgcattagccttgcgata
	R ₁ mutM	ccggcatccagactttggcaagggcagggtttcttccgttcaaa
	F ₂ mutM	aagtctggatgccggtccaat
	R ₂ mutM	GTCGACgaccgcttccttggccatata
	R _{downstream} mutM	ttcacgccggagggaac
$\Delta mutY$	F _{upstream} mutY	gcgcatgatcagttttcg
	F ₁ mutY	ggcggttttgcttaatacg
	R ₁ mutY	tgaagcgtctggaatagcggggtcataccagcgagaag
	F ₂ mutY	gctattccagacgcttcaaa
	R ₂ mutY	gcgctcgaagttttcaaac
	R _{downstream} mutY	cggttcaatccatcgattgg
$\Delta mutT$	F _{upstream} mutT	atattcgcggtggcgcatcag
	F ₁ mutT	tgccaggctcttgctattgtc
	R ₁ mutT	ggctgtcaaagcagatcgaccatgcgccgtttcttcac
	F ₂ mutT	gtcgatctgcttgacagcc
	R ₂ mutT	caagatggtcgccagcatc
	R _{downstream} mutT	ttcaaggaccaggagatgac

Tableau 4: Liste des amorces utilisées pour les souches de délétion. Les sites de restriction sont annotés en majuscules.

2.2. GoTaq®

L'enzyme goTaq® (Promega) a été utilisée pour diagnostiquer la délétion ou non du gène cible chez *B. abortus*. Pour le mix PCR, la même quantité et la même concentration de primers a été utilisée avec 0,35 µl de la polymérase (5000 unités/ml), 6 µl du 5X green goTaq® reaction buffer, 1,2 µl de dNTPs (5 mM chacun), et 1 µl de PBS contenant les *Brucella* inactivées par la chaleur (ADN template) et finalement 20,5 µl d'eau pour arriver à un volume final de 30 µl. Le cycle suit les mêmes étapes que pour la Q5®, mais avec des températures et des durées différentes : la dénaturation initiale (94°C, 4 minutes), suivie de la dénaturation (94°C, 45s), l'hybridation (1 minutes, température dépendante des primers), et l'étape d'élongation (72°C, 1 minute / 1000 paires de base), et finalement l'élongation finale (10 minutes, 72°C)

3. Ingénierie génétique

3.1. Purification d'ADN

Les produits PCR et de restriction ont d'abord été vérifiés sur gel d'agarose 1%. L'ADN est marqué par du bromure d'éthidium, un agent intercalant. Après migration, la taille des fragments d'ADN a été évaluée en comparaison avec un étalon (GeneRuler™ 0,1 µg/ml, Thermo Scientific™). Les fragments d'ADN ont ensuite été purifiés sur colonne (MSB®spin PCRapace kit, Invitex), ou sur gel (QIAquick® gel extraction kit, QIAGEN). Le choix de la méthode de purification se fait selon la présence ou non de contaminants.

3.2. Ligation

La ligation des produits PCR en plasmide a été réalisée en mixant 1 µl de la ligase, 2 µl d'eau, 4 µl du produit PCR-3, 1 µl de la solution contenant le plasmide et 2 µl de tampon de ligation (concentré 5 fois). L'échantillon a ensuite été incubé 1 heure à 37°C, ou pendant la nuit à 18°C.

3.3. Transformation

Les bactéries *E. coli* compétentes ont été obtenues par traitement au CaCl₂ (50mM) et ensuite stockées à -80°C. Pour la transformation, ces cellules ont été soumises à un choc thermique. Cinq µl de la solution contenant le plasmide ainsi que 50 µl de *E. coli* DH10B ou *E. coli* S17-1 compétentes ont été mélangés et laissés sur glace pendant 30 minutes. Les cellules ont ensuite été plongées dans un bain à 42°C pendant 1 minute. Neuf cent µl de LB ont été ajoutés au mélange et le tout incubé à 37°C pendant 45 minutes. Finalement, les cellules ont été étalées sur un milieu LB-agar plus antibiotiques appropriés et incubés à 37°C pour la nuit.

3.4. Extraction de plasmides

Trois ml de culture bactériennes ont tout d'abord été culotées dans un tube Eppendorf, et le surnageant retiré. Le culot a ensuite été resuspendu dans 300 µl de tampon P1 (RNase A 100 µg/ml, Tris HCl 50 mM, EDTA 10 mM). Trois cents µl de tampon P2 (NaOH 200 mM, SDS 1%) ont par après été ajoutés et le mélange a été incubé pendant 5 minutes à température ambiante. Finalement 300 µl de tampon P3 froid (acétate de potassium 3 M, pH 5.5) ont été ajoutés, et le mix homogénéisé par inversion. Les débris cellulaires ont ensuite été culotés par centrifugation (15 min, 15000 rpm), et le surnageant contenant l'ADN plasmidique gardé dans un nouvel

Eppendorf. L'ADN a été ensuite précipité en ajoutant 630 µl d'isopronaol et en centrifugeant (15 min, 15000 rpm). Le surnageant est ensuite retiré et 300 µl d'éthanol (70%, -20°C) est ajouté. Après une dernière centrifugation, le surnageant est enlevé et le culot mis à sécher pendant 20 minutes dans une étuve à 60°C. L'ADN est finalement resuspendu dans 25 µl d'eau et conservé à -20°C.

3.5. Restriction

Les restrictions ont aussi bien été utilisées pour diagnostiquer l'insertion ou non de fragments d'ADN en plasmide que pour restreindre des plasmides en vue de futures constructions.

Dans le premier cas, la solution de plasmide purifiée (7 µl pour le pNPTS138, 2 µl pour le pGEM-T) est mélangée avec 0,2 µl de chaque enzyme, 1 µl de tampon, et de l'eau est rajoutée pour obtenir un volume final de 10 µl. L'échantillon est ensuite incubé à 37°C pendant 1 heure. Une fraction du mélange est finalement mise à migrer sur gel d'agarose.

Dans le second cas, 20 µl du plasmide purifié est mélangé avec 0,4 µl de chaque enzyme, 2,5 µl de tampon, et de l'eau est ensuite ajoutée jusqu'à un volume final de 25 µl. L'échantillon est ensuite incubé 2 heures à 37°C. Le plasmide restreint est ensuite purifié sur gel.

3.6. Conjugaison

Pour la conjugaison, 50 µl de culture d'*E. coli* S17-1 transformée avec le plasmide d'intérêt est mélangée avec 1 ml de culture de *B. abortus* 544 Nal^R. Les bactéries sont ensuite culotées par centrifugation, lavées une fois dans du 2YT et finalement étalées sur 2YT-agar et laissées la nuit à température ambiante pour les plasmides intégratifs ou 4 heures à 37°C pour les plasmides réplcatifs. Dans le cas des plasmides intégratifs, les bactéries sont ensuite récupérées à l'aide d'une hanse, resuspendues en 2YT liquide et finalement étalées sur milieu 2YT – agar avec l'antibiotique approprié à la sélection du plasmide ainsi que de l'acide nalidixique. Dans le cas des plasmides réplcatifs, les bactéries sont récupérées à l'aide d'une hanse, et directement étalées sur 2YT – agar avec l'antibiotique approprié ainsi que de l'acide nalidixique.

3.7. Constructions

Les souches de délétion ont été obtenues par le retrait de la majorité du gène cible, incluant les sites actifs. Cependant, les 5 à 15 premiers et derniers codons ont été laissés en place, formant un mini gène. Pour ce faire, une séquence d'environ 750 paires en amont du gène et incluant les premiers codons de celui-ci sont amplifiés par PCR (PCR₁, primer forward F₁, primer reverse R₁). La même méthode a été appliquée avec la séquence en aval du gène, incluant les derniers codons (PCR₂, primer forward F₂, primer reverse R₂). Une séquence complémentaire à l'extrémité 3' du produit PCR₁ est ajoutée à l'extrémité 5' du produit PCR₂, en prenant garde à garder le cadre de lecture. Une troisième PCR d'assemblage (PCR₃, primer forward F₁, primer reverse R₂) est ensuite réalisée pour obtenir le produit final. Entre chaque étape, les produits PCR sont purifiés. Le produit PCR₃ est ensuite inséré en plasmide pNPTS138 restreint en *EcoRV* (un site unique dans le plasmide). Des *E. coli* DH10B sont ensuite transformées. D'une part, le pNPTS138 encode une séquence *lacZ'*, sous le contrôle d'un promoteur inductible par l'Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG). D'autre part, la souche DH10B encode la séquence *lacZΔM15* dans son génome. Il est donc possible de distinguer les clones d'intérêt par

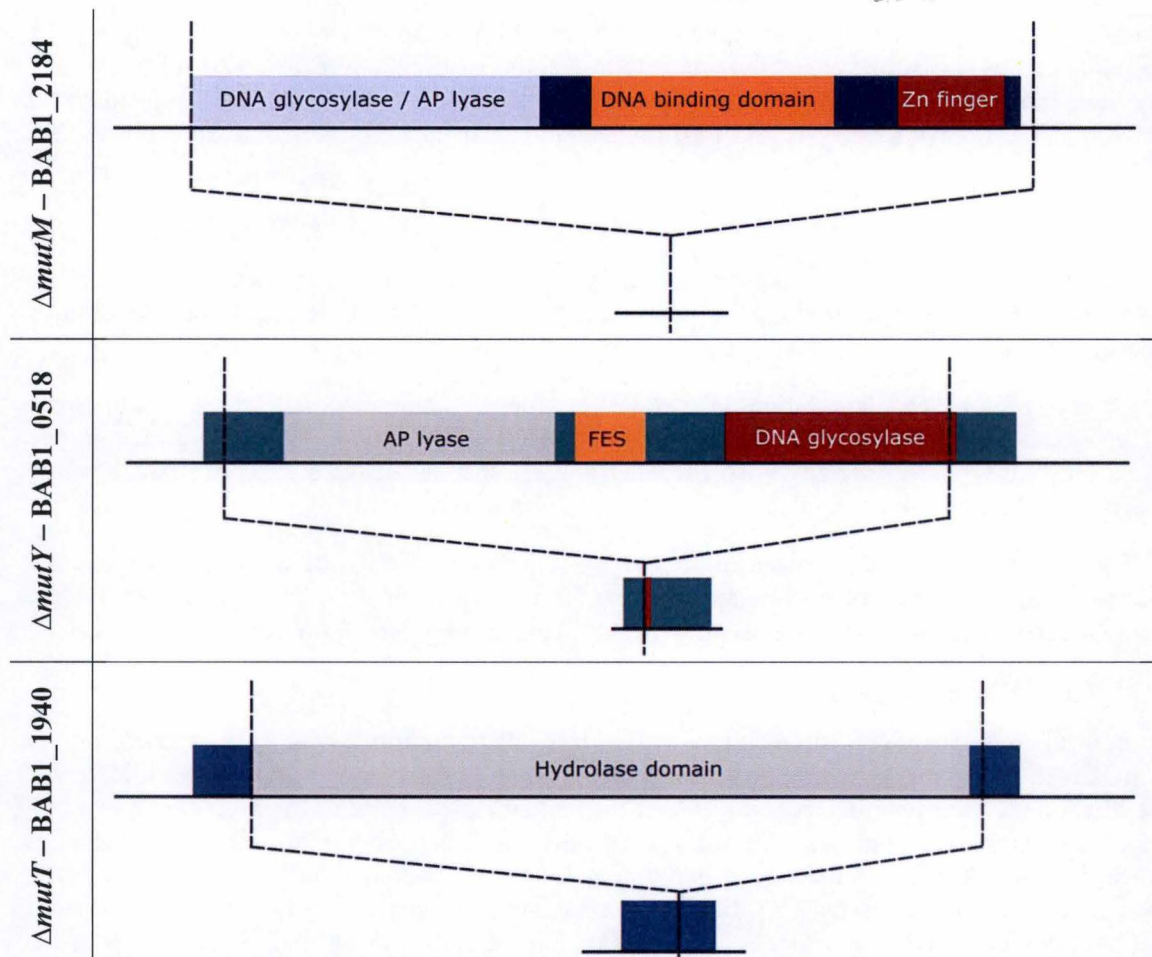


Figure 19: Représentation schématique des genes *mutM* *mutY* *mutT* et leur délétion. *mutM* est le seul gène qui a été complètement délété. Les domaines à activité ADN glycosylase sont responsables de l'hydrolyse du lien glycosidique, laissant un site abasique. Le clivage de la structure de ribose est assuré par l'activité AP lyase. La séquence FES de *mutY* est un domaine de liaison à l'ADN Fer-soufre. Le seul domaine détecté pour *mutT* est responsable de l'hydrolyse du 8-oxodGTP.

un test blanc-bleu. En effet, la β -galactosidase (enzyme encodée par la séquence *lacZ*) est capable d'hydrolyser le Xgal en un produit bleu. Or, l'insertion du produit PCR₃ dans le plasmide disrute théoriquement la séquence *lacZ'*; rendant la formation d'une enzyme LacZ pleinement fonctionnelle impossible. Les bactéries sont donc étalées sur milieu LB – agar avec IPTG, Xgal et kanamycine et incubées la nuit à 37°C. Quelques colonies blanches sont ensuite sélectionnées et mise en culture à 37°C. Le plasmide est extrait des bactéries et une restriction diagnostique est réalisée pour vérifier l'intégration correcte de l'insert. Un de ces plasmides est sélectionné et envoyé au séquençage pour vérifier l'absence de mutation dans la séquence d'intérêt. Des *E.coli* S17 sont ensuite transformées avec ce plasmide et cultivées en milieu LB agar – kanamycine. Le lendemain, une colonie isolée est remise en culture liquide. Une partie sera stockée à -80°C en LB – glycérol. L'autre partie servira à la conjugaison avec *B. abortus* 544 Nal^R. Quelques colonies isolées sont ensuite striées sur milieu 2YT – kanamycine – agar. Après 2 jours d'incubation à 37°C, une des stries est remise en culture liquide (2YT) pour la nuit. Le pNPTS138 encodant la séquence *sacB* (sensibilité au sucrose), il est possible de sélectionner les bactéries ayant excisé le plasmide par recombinaison homologue en les cultivant sur milieu 2YT – agar 5% sucrose. Les colonies isolées sont ensuite striées en parallèle sur deux milieux différents : 2YT – Kanamycin – agar et 2YT – 5% sucrose – agar. Des clones résistants à la kanamycine peuvent être retrouvés à cette étape. En effet, des mutations arrivent fréquemment dans la séquence *sacB*, résultant en une perte de la sensibilité au sucrose qui n'est pas due à l'excision du plasmide. Les stries ayant poussé sur sucrose mais pas sur kanamycine sont ensuite vérifiées par PCR en utilisant des primers en amont et en aval de la séquence amplifiée (F_{amont} et R_{aval}). La strie d'intérêt est finalement mise en culture en 2YT liquide à 37°C pour la nuit, et stockée le lendemain à -80°C en 2YT – glycérol. Un schéma représentant les différents gènes et leur délétion est disponible en Figure 19.

4. Microscopie

Les images ont été prises en utilisant un microscope Nikon 80i (objectif 100X, plan Apo, aperture 1,45) connecté à une caméra Hamamatsu ORCA – ER. Deux μ l de culture bactérienne sont déposés sur un pad de PBS agarose 1%, puis couvert d'un coverslip de 18 mm de côté et scellé à l'aide de VALAP (1/3 vaseline, 1/3 lanoline, 1/3 paraffine). Une huile d'immersion Nikon avec un indice de réfraction de 1,5150 a été utilisée.

5. Proportion de G1 après stress oxydatif

La souche *B. abortus* NoriI est cultivée en milieu 2YT liquide pour la nuit à 37°C. La culture est ensuite diluée et réincubée à 37°C. Approximativement 8 heures plus tard, la densité optique (DO) est mesurée, et la dilution à effectuer est calculée pour obtenir une DO de 0,3 le lendemain matin (phase exponentielle). Cinq-cents μ l de culture sont utilisés par condition, centrifugé et resuspendus dans le milieu approprié (2YT pour le paraquat, PBS pour le peroxide d'hydrogène), contenant l'agent stressant. Les bactéries sont ensuite cultivées pendant 3 ou 6 heures à 37°C, excepté pour le contrôle temps 0 (T0). Les bactéries sont ensuite lavées au PBS avant de réaliser des dilutions sériées. La culture initiale a été diluée jusqu'à 10⁶ fois. Des CFUs (colony forming units) sont réalisés en déposant trois gouttelettes de 20 μ l par dilution sur milieu 2YT – agar. En parallèle, des images de microscopie sont prises en exposant les bactéries 2 secondes au canal YFP, et le nombre de bactéries avec 1 ou 2 spots sont comptées.

6. Cytométrie de flux après stress oxydatif

Le stress est induit selon la méthodologie expliquée ci-dessus, mais avec 1 ml de culture au lieu de 500 µl, et à une DO ne dépassant pas 0,4. Un contrôle supplémentaire est réalisé, où de la rifampicine (20 µg/ml) est ajoutée avant d'incuber 3 heures à 37°C. Après incubation, les bactéries sont lavées 2 fois au PBS, puis 1 ml de culture est ajouté à 9 ml d'éthanol 77% à -20°C. Le mélange est ensuite vortexé et stocké à -20°C.

Les bactéries sont ensuite marquées avec un agent intercalant fluorescent : le Sytox Green (InvitrogenTM). Pour ce faire, 1 ml de cellules fixées sont lavées avec le tampon adéquat (Tris 10 mM, EDTA 1mM, Na Citrate 50 mM, Triton X-100 0,01%, pH 7,2). Les bactéries sont par après resuspendues dans le tampon avec de la RNase A (0,1 mg/ml) préalablement activée pendant 10 minutes à 99°C. Après incubation 30 minutes à température ambiante, les cellules sont culotées par centrifugation (8000 rpm, 2 minutes), et resuspendues dans 1 ml de tampon avec le Sytox Green (0,5 µM). Les cellules sont ensuite incubées 15 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière puis analysées au cytomètre de flux BD FACSCaliburTM (BD Bioscience) (laser argon, excitation 495 nm, émission 519 nm). Les données ont ensuite été traitées par le logiciel CellQuest Pro.

7. Disk assay

Les différentes souches de *B. abortus* sont cultivées pendant la nuit en 2YT liquide et diluées à une DO de 0,15. La culture est ensuite incubée à 37°C pendant 3 heures. Les bactéries en phase exponentielles sont rediluées à une DO de 0,15. Cent µl de culture sont ensuite étalés sur milieu 2YT – agar avec l'antibiotique approprié si nécessaire. Un disque de papier Whatman stérile imbibé d'une solution d'H₂O₂ 30% ou de paraquat 80 mM est ensuite appliqué au centre de la boîte de pétri. Après 2 jours à 37°C, le diamètre de la zone d'inhibition est mesuré à l'aide d'une latte.

Pour la comparaison de sensibilité au stress oxydatif entre *B. abortus* et *E. coli*, le même protocole a été utilisé. La seule différence concerne la dilution de *E. coli* : la culture est diluée à 0,45 au lieu de 0,15 avant le passage sur 2YT – agar pour garder la même densité bactérienne.

8. Courbes de croissance

Les différentes souches de *B. abortus* sont cultivées la nuit durant en 2YT liquide. Les cultures sont ensuite diluées pour atteindre une DO de 0,1. Les bactéries sont ensuite centrifugées et resuspendues dans du 2YT avec les concentrations voulues en paraquat. Chaque condition est réalisée en triplicat. Chaque puits de la plaque est ensuite rempli avec 200 µl d'échantillon ou de PBS. La plaque est enfin insérée dans la machine Bioscreen C MBR (Oy Growth Curves Ab Ltd). Les bactéries sont incubées pendant environ 3 jours à 37°C sous agitation. Les DO sont mesurées toutes les 30 minutes.

9. Infections

La veille de l'expérience, les macrophages RAW 264.7 sont dilués dans du DMEM et sérum bovin décomplémenté (Gibco®) à raison de 10^5 cellules/ml, puis 500 µl par puits sont placés dans les plaques 24 puits et enfin incubées la nuit durant à 37°C 5% CO₂. En parallèle, les différentes souches à tester sont mises en culture en milieu 2YT liquide. Le lendemain, les DO de ces cultures sont mesurées, et les bactéries diluées dans du milieu DMEM pour obtenir une MOI (multiplicity of infection) de 50, soit 50 bactéries par cellule dans un puits (on considère que les macrophages RAW se sont divisés pendant la nuit et qu'il y en a maintenant $7,5 \cdot 10^4$ cellules par puits). Le DMEM est retiré des plaques 24 puits et remplacé par le mélange DMEM – bactéries adéquat. Les plaques sont ensuite centrifugées 10 minutes à 1200 rpm à 4°C. On considère ce point comme le temps 0 (T0). Après 1 heure d'incubation à 37°C + 5% CO₂, les cellules sont lavées 3 fois au PBS et enfin mises dans du DMEM + gentamycine 50 µg/ml et replacées dans l'incubateur.

A la fin de l'expérience, les cellules sont lavées 2 fois au PBS puis plongées dans du PBS-tritonX100 0,1%. Après 10 minutes d'incubation à 37°C, les cellules sont vigoureusement flushées pour extraire les bactéries intra cellulaires. L'extrait est ensuite placé en Eppendorf avant la réalisation de dilutions sériées (dilution 1X, 5X et 25X pour les temps 2 et 5h, et 10, 50 et 250X pour le temps 24h). Trois gouttelettes de 20 µl par condition et par dilution sont enfin déposées sur milieu 2YT – agar. Après 3 jours d'incubation à 37°C, les CFUs sont comptés.

10. Marquage à l'OxyBURST® succinimidyl ester

10.1. Stock

La sonde étant sensible à l'oxydation, il est important de la conserver protégée de l'oxygène atmosphérique. La sonde OxyBURST® (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate-succinimidyl ester, ThermoFisher Scientific) est dissout dans du diméthylsulfoxyde (DMSO ; Merck) à raison de 1 mg/ml puis vortexé longuement. Ensuite, la solution est dégazée grâce à une mise sous vide pendant 20 minutes, pour éviter le contact avec l'oxygène. Enfin, la solution finale est répartie dans des tubes à PCR rempli à ras bord pour éviter tout contact avec l'oxygène. Les tubes fermés sont ensuite soigneusement enroulés dans du parafilm pour isoler au maximum la sonde de l'extérieur. Finalement, les tubes sont stockés à -80°C. La sonde fluorescente étant sensible à la lumière il est important de réaliser toutes les étapes décrites dans cette section à l'abri de la lumière.

10.2. Mises au point

Le protocole donné par la firme étant optimisé pour le marquage de protéines, il était important de mettre au point le marquage des bactéries par l'OxyBURST® (Thermo Fisher Scientific) avant de passer aux infections. Un double marquage OxyBURST®/Texas Red-succinimidyl ester (TRSE ; Invitrogen™) a aussi été testé, dans le but de pouvoir trouver les bactéries en cellule pour l'infection.

La veille de l'expérience, *B. abortus* 544 est mise en culture en 2YT et incubée la nuit à 37°C. La DO est mesurée le lendemain matin, puis 1 ml de culture par condition est placé dans un Eppendorf. Trois lavages dans du PBS sont exécutés afin d'éliminer toute trace d'amine du

milieu, qui pourrait interférer avec le marquage de la sonde. Ensuite, la sonde, et éventuellement le TRSE, est diluée dans le tampon choisi (PBS ou NaHCO_3 0,1M pH 8.5), et ce mélange est utilisé pour resuspendre les bactéries. Les tubes sont ensuite incubés à température ambiante sous agitation le temps désiré. Cent μl de solution d'hydroxylamine 1,5 M, pH 8,5 sont ajoutés afin d'hydrolyser les groupements acétyle de la sonde et l'activer. Les tubes sont ensuite remis à agitation le temps voulu à température ambiante. Les bactéries sont par après lavées 1 fois avec du PBS, puis deux fois avec le milieu final (PBS pour les mises au point). Les bactéries sont finalement resuspendues dans du PBS avec la concentration voulue en peroxyde d'hydrogène, et incubées à température ambiante sous agitation. Les bactéries sont enfin observées au microscope, avec le canal FITC (400 ms) et éventuellement le canal TRSE (400 ms), après une éventuelle fixation au paraformaldéhyde (PFA).

Bibliographie

- Anderson, E.S., Paulley, J.T., Gaines, J.M., Valderas, M.W., Martin, D.W., Menscher, E., Brown, T.D., Burns, C.S., Roop, R.M., 2009. The manganese transporter MntH is a critical virulence determinant for *Brucella abortus* 2308 in experimentally infected mice. *Infect. Immun.* 77, 3466–74. doi:10.1128/IAI.00444-09
- Arellano-Reynoso, B., Lapaque, N., Salcedo, S., Briones, G., Ciocchini, A.E., Ugalde, R., Moreno, E., Moriyón, I., Gorvel, J.-P., 2005. Cyclic beta-1,2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival. *Nat. Immunol.* 6, 618–25. doi:10.1038/ni1202
- Ariza, J., Bosilkovski, M., Cascio, A., Colmenero, J.D., Corbel, M.J., Falagas, M.E., Memish, Z. a., Roushan, M.R.H., Rubinstein, E., Sipsas, N. V., Solera, J., Young, E.J., Pappas, G., 2007. Perspectives for the treatment of brucellosis in the 21st century: The Ioannina recommendations. *PLoS Med.* 4, 1872–1878. doi:10.1371/journal.pmed.0040317
- Arts, I.S., Gennaris, A., Collet, J.-F., 2015. Reducing systems protecting the bacterial cell envelope from oxidative damage. *FEBS Lett.* 589, 1559–1568. doi:10.1016/j.febslet.2015.04.057
- Baharoglu, Z., Mazel, D., 2014. SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 1126–1145. doi:10.1111/1574-6976.12077
- Barquero-Calvo, E., Chaves-Olarte, E., S. Weiss, D., Guzman-Verri, C., Chacon-Diaz, C., Rucavado, A., Moriyón, I., Moreno, E., 2007. *Brucella abortus* Uses a Stealthy Strategy to Avoid Activation of the Innate Immune System during the Onset of Infection. doi:10.1371/journal.pone.0000631
- Bianchi, V., Haggård-Ljungquist, E., Pontis, E., Reichard, P., 1995. Interruption of the ferredoxin (flavodoxin) NADP⁺ oxidoreductase gene of *Escherichia coli* does not affect anaerobic growth but increases sensitivity to paraquat. *J. Bacteriol.* 177, 4528–31.
- Boussau, B., Karlberg, E.O., Frank, A.C., Legault, B.-A., Andersson, S.G.E., 2004. Computational inference of scenarios for alpha-proteobacterial genome evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 9722–9727. doi:10.1073/pnas.0400975101
- Brown, P.J.B., Pedro, M.A. De, Kysela, D.T., Van Der Henst, C., Kim, J., De Bolle, X., Fuqua, C., Brun, Y. V., 2011. Polar growth in the Alphaproteobacterial order Rhizobiales. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 1697–1701. doi:10.1073/pnas.1114476109
- Candeias, P., Steeden, S., 1993. Electron Transfer in Di(deoxy)nucleoside Phosphates in Aqueous Solution: Rapid Migration of Oxidative Damage (via Adenine) to Guanine. *J. Am. Chem. Soc.* 115, 2437–2440. doi:10.1021/ja00059a044

- Carlioz, A., Touati, D., 1986. Isolation of superoxide dismutase mutants in *Escherichia coli*: is superoxide dismutase necessary for aerobic life? *EMBO J.* 5, 623–630.
- Carvalho Neta, A. V, Mol, J.P.S., Xavier, M.N., Paixão, T. a., Lage, A.P., Santos, R.L., 2010. Pathogenesis of bovine brucellosis. *Vet. J.* 184, 146–155. doi:10.1016/j.tvjl.2009.04.010
- Celli, J., 2015. The changing nature of the *Brucella* -containing vacuole. *Cell. Microbiol.* 17, 951–958. doi:10.1111/cmi.12452
- Celli, J., 2006. Surviving inside a macrophage: The many ways of *Brucella*. *Res. Microbiol.* 157, 93–98. doi:10.1016/j.resmic.2005.10.002
- Celli, J., de Chastellier, C., Franchini, D.-M., Pizarro-Cerda, J., Moreno, E., Gorvel, J.-P., 2003. *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J. Exp. Med.* 198, 545–556. doi:10.1084/jem.20030088
- Cellier, M.F., Courville, P., Champion, C., 2007. Nramp1 phagocyte intracellular metal withdrawal defense. *Microbes Infect.* 9, 1662–70. doi:10.1016/j.micinf.2007.09.006
- Chang, P.W., Zhang, Q.M., Takatori, K., Tachibana, A., Yonei, S., 2005. Increased sensitivity to sparsely ionizing radiation due to excessive base excision in clustered DNA damage sites in *Escherichia coli*. *Int. J. Radiat. Biol.* 81, 115–23. doi:10.1080/09553000500103009
- Chang, X., Lu, W., Dou, T., Wang, X., Lou, D., Sun, X., Zhou, Z., 2013. Paraquat inhibits cell viability via enhanced oxidative stress and apoptosis in human neural progenitor cells. *Chem. Biol. Interact.* 206, 248–255. doi:10.1016/j.cbi.2013.09.010
- Comerci, D.J., Martínez-Lorenzo, M.J., Sieira, R., Gorvel, J.P., Ugalde, R. a., 2001. Essential role of the virB machinery in the maturation of the *Brucella abortus*-containing vacuole. *Cell. Microbiol.* 3, 159–168. doi:10.1046/j.1462-5822.2001.00102.x
- Curtis, P.D., Brun, Y. V., 2010. Getting in the Loop: Regulation of Development in *Caulobacter crescentus*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 13–41. doi:10.1128/MMBR.00040-09
- Deghelt, M., Mullier, C., Sternon, J.-F., Francis, N., Laloux, G., Dotreppe, D., Van der Henst, C., Jacobs-Wagner, C., Letesson, J.-J., De Bolle, X., 2014. G1-arrested newborn cells are the predominant infectious form of the pathogen *Brucella abortus*. *Nat. Commun.* 5, 4366. doi:10.1038/ncomms5366
- Dizdaroglu, M., 2005. Base-excision repair of oxidative DNA damage by DNA glycosylases. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 591, 45–59. doi:10.1016/j.mrfmmm.2005.01.033
- Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M., Rodriguez, H., 2002. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic. Biol. Med.* 32, 1102–15.

- Dizdaroglu, M., Rao, G., Halliwell, B., Gajewski, E., 1991. Damage to the DNA bases in mammalian chromatin by hydrogen peroxide in the presence of ferric and cupric ions. *Arch. Biochem. Biophys.* 285, 317–24.
- Dozot, M., Boigegrain, R.-A., Delrue, R.-M., Hallez, R., Ouahrani-Bettache, S., Danese, I., Letesson, J.-J., De Bolle, X., Köhler, S., 2006. The stringent response mediator Rsh is required for *Brucella melitensis* and *Brucella suis* virulence, and for expression of the type IV secretion system virB. *Cell. Microbiol.* 8, 1791–802. doi:10.1111/j.1462-5822.2006.00749.x
- Dukan, S., Nyström, T., 1998. Bacterial senescence: Stasis results in increased and differential oxidation of cytoplasmic proteins leading to developmental induction of the heat shock regulon. *Genes Dev.* 12, 3431–3441. doi:10.1101/gad.12.21.3431
- Dupre-Crochet, S., Erard, M., Nüsse, O., 2013. ROS production in phagocytes: why, when, and where? *J. Leukoc. Biol.* 94, 657–670. doi:10.1189/jlb.1012544
- Fan, Y., Wu, J., Ung, M.H., De Lay, N., Cheng, C., Ling, J., 2015. Protein mistranslation protects bacteria against oxidative stress. *Nucleic Acids Res.* 43, 1740–8. doi:10.1093/nar/gku1404
- Fang, F.C., 2004. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 820–32. doi:10.1038/nrmicro1004
- Flannagan, R.S., Cosío, G., Grinstein, S., 2009. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 355–66. doi:10.1038/nrmicro2128
- Fowler, R.G., White, S.J., Koyama, C., Moore, S.C., Dunn, R.L., Schaaper, R.M., 2003. Interactions among the *Escherichia coli* mutT, mutM, and mutY damage prevention pathways. *DNA Repair (Amst)*. 2, 159–173. doi:10.1016/S1568-7864(02)00193-3
- Galińska, E.M., Zagórski, J., 2013. Brucellosis in humans--etiology, diagnostics, clinical forms. *Ann. Agric. Environ. Med.* 20, 233–8.
- Gay, B., Sanchez-Teff, S., Caravano, R., 1984. Ultrastructural localization of NADPH-oxidase activity in murine peritoneal macrophages during phagocytosis of *Brucella*. Correlation with the production of superoxide anions. *Virchows Arch. B. Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* 45, 147–55.
- Gee, J.M., Valderas, M.W., Kovach, M.E., Grippe, V.K., Robertson, G.T., Ng, W.-L., Richardson, J.M., Winkler, M.E., Roop, R.M., 2005. The *Brucella abortus* Cu,Zn superoxide dismutase is required for optimal resistance to oxidative killing by murine macrophages and wild-type virulence in experimentally infected mice. *Infect. Immun.* 73, 2873–80. doi:10.1128/IAI.73.5.2873-2880.2005

- Graves, R.J., Felzenszwalb, I., Laval, J., O'Connor, T.R., 1992. Excision of 5'-terminal deoxyribose phosphate from damaged DNA is catalyzed by the Fpg protein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 267, 14429–35.
- Gray, M.W., Burger, G., Lang, B.F., 1999. Mitochondrial Evolution 283, 1476–1482. doi:10.1126/science.283.5407.1476
- Hallez, R., Bellefontaine, A.-F., Letesson, J.-J., De Bolle, X., 2004. Morphological and functional asymmetry in alpha-proteobacteria. *Trends Microbiol.* 12, 361–365. doi:10.1016/j.tim.2004.06.002
- Hassan, H.M., Fridovich, I., 1979. Intracellular production of superoxide radical and of hydrogen peroxide by redox active compounds. *Arch. Biochem. Biophys.* 196, 385–395. doi:10.1016/0003-9861(79)90289-3
- Hassan, M., Fridovich, I., 1978. Superoxyde radical and the oxygen enhancement of the toxicity of paraquat in *Escherichia coli* 253, 8143–8148.
- Imlay, J. a, 2013. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 443–54. doi:10.1038/nrmicro3032
- Imlay, J.A., 2015. Diagnosing oxidative stress in bacteria: not as easy as you might think. *Curr. Opin. Microbiol.* 24C, 124–131. doi:10.1016/j.mib.2015.01.004
- James, P.E., Grinberg, O.Y., Michaels, G., Swartz, H.M., 1995. Intraphagosomal oxygen in stimulated macrophages. *J. Cell. Physiol.* 163, 241–7. doi:10.1002/jcp.1041630204
- Jin, D.J., Gross, C.A., 1988. Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli* rpoB gene that lead to rifampicin resistance. *J. Mol. Biol.* 202, 45–58.
- Kohler, S., Foulongne, V., Ouahrani-Bettache, S., Bourg, G., Teyssier, J., Ramuz, M., Liautard, J.-P., 2002. The analysis of the intramacrophagic virulome of *Brucella suis* deciphers the environment encountered by the pathogen inside the macrophage host cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 15711–6. doi:10.1073/pnas.232454299
- Li, G.-M., 2010. Novel molecular insights into the mechanism of GO removal by MutM. *Cell Res.* 20, 116–118. doi:10.1038/cr.2010.15
- Liu, Y., Imlay, J.A., 2013. Cell death from antibiotics without the involvement of reactive oxygen species. *Science* 339, 1210–3. doi:10.1126/science.1232751
- Loisel-Meyer, S., Jiménez de Bagüés, M.P., Köhler, S., Liautard, J.-P., Jubier-Maurin, V., 2005. Differential use of the two high-oxygen-affinity terminal oxidases of *Brucella suis* for in vitro and intramacrophagic multiplication. *Infect. Immun.* 73, 7768–71. doi:10.1128/IAI.73.11.7768-7771.2005

- Mandsberg, L.F., Ciofu, O., Kirkby, N., Christiansen, L.E., Poulsen, H.E., Høiby, N., 2009. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains with increased mutation frequency due to inactivation of the DNA oxidative repair system. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 2483–2491. doi:10.1128/AAC.00428-08
- Masson, P.L., Heremans, J.F., Schonke, E., 1969. Lactoferrin, an iron-binding protein in neutrophilic leukocytes. *J. Exp. Med.* 130, 643–58.
- Moreno, E., 2014. Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis. *Front. Microbiol.* 5, 1–18. doi:10.3389/fmicb.2014.00213
- Moreno, E., Moriyón, I., 2006. The genus *Brucella*. *Prokaryotes* 5, 315–456. doi:10.1007/0-387-30745-1_17
- Mosel, M., Li, L., Drlica, K., Zhao, X., 2013. Superoxide-mediated protection of *Escherichia coli* from antimicrobials. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 5755–9. doi:10.1128/AAC.00754-13
- Murphy, M.P., Cocheme, H.M., 2009. The Uptake and Interactions of the Redox Cycler Paraquat with Mitochondrial Function. Elsevier Inc. doi:10.1016/S0076-6879(08)04422-4
- Naroeni, A., Porte, F., 2002. Role of Cholesterol and the Ganglioside GM 1 in Entry and Short-Term Survival of *Brucella suis* in Murine Macrophages. *Infect. Immun.* 70, 1640–1644. doi:10.1128/IAI.70.3.1640
- Paulley, J.T., Anderson, E.S., Roop, R.M., 2007. *Brucella abortus* Requires the Heme Transporter BhuA for Maintenance of Chronic Infection in BALB/c Mice. *Infect. Immun.* 75, 5248–5254. doi:10.1128/IAI.00460-07
- Paulsen, I.T., Seshadri, R., Nelson, K.E., Eisen, J. a, Heidelberg, J.F., Read, T.D., Dodson, R.J., Umayam, L., Brinkac, L.M., Beanan, M.J., Daugherty, S.C., Deboy, R.T., Durkin, a S., Kolonay, J.F., Madupu, R., Nelson, W.C., Ayodeji, B., Kraul, M., Shetty, J., Malek, J., Van Aken, S.E., Riedmuller, S., Tettelin, H., Gill, S.R., White, O., Salzberg, S.L., Hoover, D.L., Lindler, L.E., Halling, S.M., Boyle, S.M., Fraser, C.M., 2002. The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 13148–13153. doi:10.1073/pnas.192319099
- Pizarro-Cerdá, J., Moreno, E., Sanguedolce, V., Mege, J.L., Gorvel, J.P., 1998. Virulent *Brucella abortus* prevents lysosome fusion and is distributed within autophagosome-like compartments. *Infect. Immun.* 66, 2387–92.
- Porte, F., Liautard, J.P., Köhler, S., 1999. Early acidification of phagosomes containing *Brucella suis* is essential for intracellular survival in murine macrophages. *Infect. Immun.* 67, 4041–7.

- Porte, F., Naroeni, A., Ouahrani-Bettache, S., Liautard, J.-P., 2003. Role of the *Brucella suis* lipopolysaccharide O antigen in phagosomal genesis and in inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages. *Infect. Immun.* 71, 1481–90.
- Prolo, C., Álvarez, M.N., Radi, R., 2015. Peroxynitrite, a potent macrophage-derived oxidizing cytotoxin to combat invading pathogens 40, 215–225. doi:10.1002/biof.1150.Peroxynitrite
- Robinson-Dunn, B., 2002. The microbiology laboratory's role in response to bioterrorism. *Arch.Pathol.Lab.Med.* 126, 291–294. doi:10.1043/0003-9985(2002)126<0291:TMLSRI>2.0.CO;2
- Roop, R.M., Gaines, J.M., Anderson, E.S., Caswell, C.C., Daniel, W., 2013. Survival of the fittest: how *Brucella* strains adapt to their intracellular niche in the host. *Med. Microbiol. Immunol.* 198, 221–238. doi:10.1007/s00430-009-0123-8.Survival
- Shaw, G.H., 2008. Earth's atmosphere – Hadean to early Proterozoic. *Chemie der Erde - Geochemistry* 68, 235–264. doi:10.1016/j.chemer.2008.05.001
- Starr, T., Ng, T.W., Wehrly, T.D., Knodler, L.A., Celli, J., 2008. *Brucella* intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment. *Traffic* 9, 678–94. doi:10.1111/j.1600-0854.2008.00718.x
- Sun, Y.H., den-Hartigh, A.B., Santos, R., Adams, G.L., Tsolis, R.M., 2002. virB-Mediated survival of *Brucella abortus* in mice and macrophages is independent of a functional inducible nitric oxide synthase or NADPH oxidase in macrophages. *Infect. Immun.* 70, 4826–4832. doi:10.1128/IAI.70.9.4826-4832.2002
- Taketani, S., 2005. Aquisition, mobilization and utilization of cellular iron and heme: endless findings and growing evidence of tight regulation. *Tohoku J. Exp. Med.* 205, 297–318.
- Valderas, M.W., Alcantara, R.B., Baumgartner, J.E., Bellaire, B.H., Robertson, G.T., Ng, W.-L., Richardson, J.M., Winkler, M.E., Roop, R.M., 2005. Role of HdeA in acid resistance and virulence in *Brucella abortus* 2308. *Vet. Microbiol.* 107, 307–12. doi:10.1016/j.vetmic.2005.01.018
- van der Veen, S., Tang, C.M., 2015. The BER necessities: the repair of DNA damage in human-adapted bacterial pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 83–94. doi:10.1038/nrmicro3391
- von Bargen, K., Gorvel, J.-P., Salcedo, S.P., 2012. Internal affairs: investigating the *Brucella* intracellular lifestyle. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 533–562. doi:10.1111/j.1574-6976.2012.00334.x
- Yoon, S.-H., Lee, H.-S., Choi, J.-Y., Kang, H.-K., Lee, J.-J., Hyun, J.-W., Choi, J., Ye, S.-K., Chung, M.-H., 2003. MutY is down-regulated by oxidative stress in *E. coli*. *Free Radic. Res.* 37, 873–879. doi:10.1080/1071576031000150760